GENTAMICIN-(3)-N-ACETYLTRANSFERASEN: STRUKTUR, VERWANDTSCHAFT UND EXPRESSION DER GENE UNTER TEILWEISER KONTROLLE DES IS140 ELEMENTES

Barbara Bräu

Diss
München
1985

GENTAMICIN-(3)-N-ACETYLTRANSFERASEN: STRUKTUR, VERWANDTSCHAFT UND EXPRESSION DER GENE UNTER TEILWEISER KONTROLLE DES IS140 ELEMENTES

Dissertation

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Barbara Bräu

aus

München

August 1984

1. Berichterstatter: P.D. Dr. W. Piepersberg

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R.J. Schweyen

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Oktober 1984

Abkürzungen

A	=	Adenosin-5'-phosphat
Ax	=	Absorption bei x nm
AAC	=	Aminocyclitol-Acetyltransferase
AcetylCoA	=	Acetyl-Coenzym A
AGA	=	Aminoglykosid-Antibiotika
APH	=	Aminocyclitol-Phosphoryltransferase
ATP	=	Adenosin-5'-triphosphat
dATP	=	2-Desoxy-adenosin-5'-triphosphat
bp	=	Basenpaare
C	=	Cytosin-5'-phosphat
DNase	=	Desoxyribonuklease
DNS	=	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	=	Ethylendiamintetraessigsäure (Na-Salz)
G	=	Guanosin-5'-phosphat
h	=	Stunden
IS	=	Insertionssequenz
kb	=	Kilobasenpaare
K_M	=	Michaelis-Menten-Konstante
LB	=	Luria broth
MHK	=	Minimale Hemmkonzentration
Min.	=	Minuten
PPO	=	2,5-Diphenyloxazol
RNase	=	Ribonuklease
SDS	=	Natrium-Dodecylsulfat
T	=	Thymidin-5'-phosphat
TCA	=	Trichloressigsäure
Tn	=	Transposon
Tris	=	Tris (hydroxymethyl) aminomethan

Abkürzungen (Fortsetzung)[a]

U	= Uridin-5'-phosphat
UV	= Ultraviolett
WM	= Werkman

[a] Aminosäuren wurden nach den Empfehlungen der IUPAC-IUB Kommission abgekürzt.
Für plasmidkodierte Funktionen wurde die von R.P. Novick (23) vorgeschlagene Nomenklatur verwendet.
Die Bezeichnungen von Restriktionsendonukleasen entsprachen den von den jeweiligen Herstellern verwendeten Abkürzungen.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
A.	EINLEITUNG	1
B.	MATERIAL UND METHODEN	7
I.	Bakterienstämme, Plasmide und Bakteriophagen	7
II.	Nährmedien	11
III.	Kulturbedingungen und Aufbewahrung von Bakterienstämmen	12
IV.	Genetische Methoden	13
1.	Isolierung von Plasmid-DNS	13
2.	Isolierung von Bakteriophagen-DNS	13
3.	Spaltung von Plasmid- oder Phagen-DNS mit Restriktionsendonukleasen, Isolierung von DNS-Fragmenten und Ligation mit T4-Ligase ("Klonierung")	14
4.	Transformation und Transfektion	16
5.	DNS-Sequenzierung	18
5.1	Didesoxynukleotidmethode nach Sanger	18
5.2	Chemische Spaltung nach Maxam und Gilbert	18
6.	Gelelektrophoretische Methoden zur Auftrennung von DNS-Fragmenten und Plasmid-DNS	19
6.1	Agarosegelelektrophorese	19
6.2	Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese	20
7.	DNS/DNS-Hybridisierungsmethoden	20
8.	Computerprogramme	21

Seite

V. Proteinchemische Methoden 22

1. Reinigung der Aminoglykosid-(3)-N-Acetyltransferase IV 22

1.1 Anzucht und Aufschluß der Zellen 22

1.2 Präparation eines ribosomenfreien Extraktes (S100) 22

1.3 Ammoniumsulfatfällung 23

1.4 Affinitätschromatographie 23

2. Aminoglykosid-Acetyltransferasetest 24

3. Proteinbestimmung 25

4. Gelelektrophoretische Methoden zur Auftrennung von Proteinen 25

4.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli 25

4.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese nach O'Farrell 26

5. Partielle Proteolyse von Proteinen mit Staphylococcus aureus V8 Protease 27

6. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz 27

7. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration 28

VI. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) durch Plattenverdünnungstests 29

VII. Enzyme und Chemikalien 29

C. ERGEBNISSE 31

I. Analyse von aacC3 Genen 31

1. Physikalische Kartierung AAC(3)-III kodierender Plasmide und Lokalisation von Antibiotika-Resistenzgenen und IS140 31

Seite

2. Expression von aacC3 Genen in Minizellen, und Nachweis der Transkriptionsrichtung im Fall von pWP14a 37

3. DNS-Sequenzierung der Promotorregion des aacC3 Gens des Plasmids pWP14a und des rechten Endes von IS140 38

II. Analyse von aacC4 Genen 42

1. Physikalische Kartierung AAC(3)-IV kodierender Plasmide und Lokalisation von Antibiotika-Resistenzgenen und IS140 42

2. Expression der Apramycin- und Hygromycin B-Resistenzgene des Plasmids pWP7b in Minizellen, und Hinweise auf das Vorliegen einer polycistronischen Struktur 45

3. DNS-Sequenzierung des aacC4 Gens 47

III. Vergleich der DNS-Sequenzen der aacC3 und aacC4 Gene und der daraus ermittelten Aminosäuresequenzen 53

IV. Anreicherung und Charakterisierung der Aminoglykosid-(3)-N-Acetyltransferase vom Typ IV 56

1. Anreicherung der Aminoglykosid-(3)-N-Acetyltransferase vom Typ IV 56

2. Reinheitskriterien 60

2.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese 60

2.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese nach O'Farrell 60

3. Hinweise für das Vorliegen von zwei verschiedenen Konformationen der Acetyltransferase in SDS-Polyacrylamidgelen 61

3.1 Partielle Proteolyse mit Staphylococcus aureus V8 Protease 61

3.2 Weitere Hinweise für das Auftreten von zwei verschiedenen Konformationen der Acetyltransferase in SDS-Polyacrylamidgelen 62

Seite

4. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz der gereinigten Aminoglykosid-(3)-N-Acetyltransferase vom Typ IV 63

5. Charakterisierung des gereinigten AAC(3)-IV Enzyms 64

5.1 Bestimmung des Molekulargewichts und der Untereinheitenstruktur 65

5.2 Bestimmung des isoelektrischen Punktes 65

5.3 Abhängigkeit der Acetyltransferaseaktivität vom pH und von der $MgCl_2$-Konzentration 67

5.4 Vergleich der Michaelis-Menten Konstanten (K_M) des gereinigten AAC(3)-IV Enzyms für verschiedene AGA und Korrelation mit entsprechendem Resistenzphänotyp eines Stammes (MHK-Bestimmung) 68

D. DISKUSSION 72

1. Eigenschaften des von pWP7b kodierten AAC(3)-IV Enzyms im Vergleich zu anderen AAC(3) Enzymen 72

2. Struktur, Expression und Verbreitung von aacC3 Genen 75

3. Struktur und Expression der Apramycin- und Hygromycin B-Resistenzdeterminanten verwandter Plasmide 80

4. Vergleich der aacC3 und aacC4 Gene sowie deren Genprodukte 83

5. Verbreitung von Gentamicin-Resistenzgenen 85

6. Inseriert IS140 bei der Kointegratbildung promotorspezifisch? 87

7. Mögliche Anwendungen der im Verlauf dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse 92

E. ZUSAMMENFASSUNG 93

F. LITERATURVERZEICHNIS 96

A. EINLEITUNG

Gentamicin ist ein die eubakterielle Proteinbiosynthese hemmendes Aminoglykosid Antibiotikum (AGA), das seit etwa 1970 weltweit in der Humantherapie gegen schwere nosokomiale Infektionen durch gramnegative Bakterien eingesetzt wird. In den letzten Jahren traten in Kliniken zunehmend Gentamicin-resistente Erreger auf (1), so daß die Entwicklung neuer AGA wie des Amikacins notwendig war. Amikacin-resistente Bakterien wurden jedoch inzwischen ebenfalls beschrieben (2).

Die AGA-Resistenz beruhte teilweise auf chromosomal kodierten Veränderungen der Ribosomen, der Cytoplasmamembran oder der äußeren Membran (1, 3). Als epidemiologisch überwiegend erwiesen sich jedoch plasmidkodierte modifizierende Enzyme (1), deren Lokalisation im Cytoplasma in einem Fall gezeigt wurde (2). Der Mechanismus der AGA-Resistenz durch modifizierende Enzyme ist noch nicht geklärt. Von einigen Autoren wird angenommen, daß modifizierte AGA den aktiven Transport unveränderter AGA in die Zelle hemmen (1, 3). Gentamicin-Acetyltransferasen und Adenylyltransferasen wurden häufig bei gramnegativen Bakterien nachgewiesen, bei Staphylococcen außerdem auch Phosphoryltransferasen (1). In neuerer Zeit wurde aus verschiedenen Staphylococcen ein bifunktionelles Enzym von 56 kd isoliert, welches AAC(6') und APH(2'') Aktivität besaß (4).

AGA modifizierende Enzyme wurden auch in Antibiotika produzierenden Aktinomyceten nachgewiesen, wobei der Mechanismus der Resistenz gegen die jeweils gebildeten Antibiotika noch unklar ist (1). Folglich könnten plasmidkodierte Resistenzgene verwandt sein und ursprünglich aus Antibiotika produzierenden Organismen stammen (5). Gray und Fitch (6) zeigten Homologie der Gene für Aminoglykosid-(3')-Phosphoryltransferasen aus verschiedenen gramnegativen und grampositiven Bakterien sowie aus AGA produzierenden Mikroorganismen.

Die Verbreitung plasmidkodierter modifizierender Enzyme erfolgt vorwiegend durch Konjugation und Mobilisation, daneben möglicherweise auch durch Transduktion (7). Die Ausbreitung von Resistenzgenen in verschiedenen Replikons ermöglicht die Überwindung von Inkompatibilitätsbarrieren und kann zur Stabilisierung plasmidkodierter Resistenzdeterminanten durch Integration ins Chromosom führen (s. Abb. 1). An diesen Prozessen sind homologe und illegitime Rekombinationsereignisse beteiligt wie Transposition und Kointegration.

Bei der Untersuchung des Gentamicin-Resistenzgens des Plasmids pWP14a aus Pseudomonas aeruginosa wurde ein neuartiges, 820 bp transponierbares Element, IS140, entdeckt, welches Fusion von Plasmiden oder von Plasmiden und Prophagen-DNS bewirkte (7) und an der Rekombination von Plasmiden mit dem Chromosom beteiligt war (8). IS140 erwies sich mit den inzwischen von zwei weiteren Arbeitsgruppen unabhängig isolierten transponierbaren Elementen IS15 Δ (8, 10) und IS26 (9) als identisch. IS140 bildet recA unabhängig Kointegratstrukturen, in denen das Element an den Fusionsstellen in direkter Orientierung verdoppelt

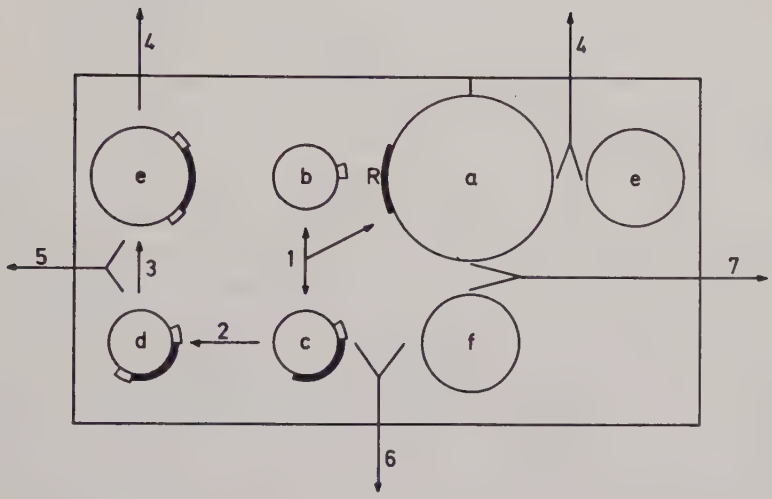

Abbildung 1:

Mögliche Mechanismen für die Ausbreitung von Antibiotika-Resistenzgenen (R) in verschiedenen Replikons (1-3) einer Bakterienzelle und Übertragung auf andere Zellen derselben oder einer anderen Spezies (4-7).
Verwendete Symbole: a = Chromosom; b, c, d = nicht konjugierbare Plasmide; e = konjugierbares Plasmid; f = Prophagengenom (z.B. P1-Phage); ausgefüllter Balken = Antibiotika-Resistenzgen; nicht ausgefüllter Balken = Insertionssequenz (z.B.: IS140); 1 = homologe oder illegitime Rekombinationsereignisse; 2 = duplikative Inversion der Insertionssequenz oder Replikonfusion zweier c-Plasmide und anschließende homologe Rekombination zwischen zwei Kopien der Insertionssequenz (s. Abb. 8); 3 = Transposition; 4 = Konjugation; 5 = Mobilisation; 6 = spezielle Transduktion; 7 = allgemeine Transduktion.

vorliegt (7). Ein verwandtes Element, IS15, enthält IS140 teilweise dupliziert und führt vorwiegend zu Transpositionsereignissen (10). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist IS140 an der Expression benachbarter Gentamicin-Resistenzgene beteiligt, d.h. ein Teil der Promotorstrukturen für aacC Gene liegt innerhalb von IS140. Durch Kointegratbildung und anschließende Rekombinations- und Deletionsprozesse könnten IS140 assoziierte Gentamicin-Resistenzdeterminanten in verschiedenen Replikons verbreitet worden sein (7, 8). Gentamicin-Resistenzgene wurden bei gramnegativen und grampositiven Bakterien innerhalb von Vielfachresistenztransposons nachgewiesen (11, 12). Bisher wurde ein einziges nur für Gentamicin- und Tobramycin-Resistenz kodierendes Transposon isoliert (13).

In dieser Arbeit sollten die Gene für Aminoglykosid-(3)-N-Acetyltransferasen der Klassen III und IV (1) sowie deren Genprodukte untersucht werden. AAC(3) Enzyme katalysieren die Übertragung des Acetylrestes von Acetyl-Coenzym A auf die Aminogruppe in Position 3 des 2-Desoxystreptaminringes und wurden aufgrund der in Tabelle 1 zusammengefaßten Eigenschaften in sechs Klassen unterteilt (1, 14, 15, 16). AAC(3)-IV Enzyme weisen dasselbe Spektrum von Substraten auf wie Aminoglykosid-(3)-N-Acetyltransferasen der Klasse III, modifizieren jedoch zusätzlich Apramycin, ein monosubstituiertes 2-Desoxystreptaminderivat von geringem therapeutischen Wert.

In dieser Arbeit sollte gezeigt werden, inwieweit aacC3 und aacC4 Gene verwandt sind. Im Fall des aacC4 Gens sollte darüber hinaus die genetische Organisation des benachbarten Hygromycin B-Resistenzgens analysiert werden. Hygromycin B ist ein mit Apramycin strukturell verwandtes AGA,

Tabelle 1: Substratspektrum und molekulare Eigenschaften verschiedener Klassen von Aminoglykosid-(3)-N-Acetyltransferasen (1, 14, 15)

Klasse	Herkunft[a]		AGA-Substratspektrum[b]	molekulare Eig.[b]			Referenz
	Organismus	Replikon		pIP	MG	UE	
AAC(3)-I	P. aeruginosa, E. coli	pJR88 (R135)	Gm Sm Fm	7,4	17	α_4	1
AAC(3)-II	Klebsiella sp.	R-Plasmid	Gm Sm	6,4	n.b.	n.b.	1
AAC(3)-III	P. aeruginosa	pWP14a	Gm Sm Nt Km Tm Pm Nm	n.b.	31	n.b.	1,7
AAC(3)-IV	S. typhimurium	pWP7b	Gm Sm Nt Km Tm Pm Nm Am	5,6	29	α	1,25
AAC(3)-V	Enterobacteriaceen	R-Plasmid	Gm Sm Nt Tm Db	n.b.	n.b.	n.b.	14
AAC(3)-VI	E. coli	Chromosom	Pm Nm Am	n.b.	n.b.	n.b.	15

[a] Außer den erwähnten Beispielen wurden ähnliche AAC(3) Enzyme aus einer Vielzahl gramnegativer Bakterien isoliert (1, 7, 14, 15, 25).

[b] Verwendete Symbole: pIP = Isoelektrischer Punkt; MG = Molekulargewicht einer Untereinheit in kd; UE = Untereinheitenstruktur; α = monomer; α_4 = tetramer; n.b. = nicht bestimmt;
Gm = Gentamicin; Sm = Sisomicin; Fm = Fortimicin; Nt = Netilmicin; Km = Kanamycin; Tm = Tobramycin; Pm = Paromomycin; Nm = Neomycin; Am = Apramycin; Db = Dikekacin

das die Proteinbiosynthese von Prokaryonten und Eukaryonten hemmt und in der Veterinärmedizin gegen Spulwürmer eingesetzt wird. Das von Rao et.al (17) beschriebene APH(4) Enzym bewirkt Resistenz gegen Hygromycin B. Die Apramycin-Hygromycin B-Resistenzdeterminante von in dieser Arbeit untersuchten Plasmiden eignet sich für die Konstruktion sog. Schaukel - Vektoren, um in Eukaryonten fremde Gene zu klonieren (18).

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Bakterienstämme, Plasmide und Bakteriophagen

Tabelle 2: Escherichia coli K-12 Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
C600	thi-1 thr-1 leuB6 hsdK$^-$ lacY1 supE44 tonA21 λ^- F$^-$	Laborsammlung
K802NR	thi$^-$ met$^-$ hsdK$^-$ gal$^-$ supE F$^-$ rif^r nal^r	J. Davies (1)
W677	thr leu mal gal lac xyl F$^-$	J. Davies (1)
JM103	thi Δ lacpro strA supE endA sbcB15 hsdR4 F' traD36 proAB lacI^{Q}Z$_\Delta$M15	J. Messing (19)
DS410	thi minA minB ara lacY xyl malA mtl tonA rpsL Azi^r λ^-	H.Hennecke (20)
H112	λcI857 Sam7	Laborsammlung

Tabelle 3: R-Plasmide von aus der Klinik isolierten gram-negativen Bakterienstämmen

Bezeichnung[a]	ursprünglicher Wirt	Größe (kb)[b]	relevanter Phänotyp[b]	Herkunft oder Referenz
pWP14a	Pseudomonas aeruginosa A22771	21,2	Tra^- Ap Gm, AAC(3)-III	USA (Hawai), P.A. Kresel
pWP12a	Klebsiella pneumoniae A22552	21,2	Tra^- Ap Gm, AAC(3)-III	USA (Boston) P.A. Kresel
pWP113a	Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescens	18,0	Tra^- Ap Gm, AAC(3)-III	USA, Schering Collection
pWP116a	Klebsiella pneumoniae	18,5	Tra^- Ap Sm/Sp Gm, AAC(3)-III	Chile, Schering Collection
pWP7a, pWP7b	Salmonella typhimurium	16,0, 13,2	Tra^- Hy Gm, AAC(3)-IV	USA, E.V. Morse (21)
pWP41a, pWP41b	Salmonella sp.	27,0, 13,2	Tra^- Hy Gm, AAC(3)-IV	USA, E.V. Morse
pJR225	E. coli, K. pneumoniae, Arizona sp.	ca.35	Tra^+ Tc Hy Gm, AAC(3)-IV	J. Davies (1, 16)
pJR88 (= R135)	Pseudomonas aeruginosa, E. coli	n.b.	Sm Gm, AAC(3)-I	J. Davies (22)

[a] Die genannten Plasmide sind Transkonjuganten von K802NR (P1Cm) und wurden mit Ausnahme von pJR225 in C600 transformiert. pJR225 lag in W677 vor.

[b] Verwendete Symbole: n.b. = nicht bestimmt; kb = Kilobasenpaare; Hy = Hygromycin B-Resistenz; die Bezeichnung weiterer Antibiotika-Resistenzphänotypen entspricht der von Novick et.al. (1976) vorgeschlagenen Nomenklatur (23).

Tabelle 4: Durch in vitro Rekombination erhaltene Plasmide

Bezeichnung	Länge (kb)[a]	relevanter Phänotyp[a]	Herkunft und Referenz
pWP701	6,05	Tc Gm	1,65 kb PstI Fragment von pWP7b in pBR322/PstI kloniert (diese Arbeit)
pWP703	7,9	Ap Gm Hy	3,5 kb SalI Fragment von pWP7b in pBR322/SalI kloniert (diese Arbeit)
pWP703-1	5,3	Ap	2,6 kb XhoI/SalI Fragment in pWP703 deletiert (diese Arbeit)
pWP703-2	6,75	Ap	1,15 kb SalI/XhoI Fragment in pWP703 deletiert (diese Arbeit)
pWP85	12,7	Ap Gm	6,9 kb BglII Fragment von pWP14a in pKC7/BglII kloniert (7,24)
pWP86	9,3	Ap Tc Gm	4,9 kb EcoRI Fragment von pWP14a in pBR322/EcoRI kloniert (7,24)
pWP866, pWP867	5,65	Ap Gm	1,25 kb SalI Fragment von pWP14a in pBR322/SalI in zwei verschiedenen Orientierungen kloniert (diese Arbeit, siehe Abb. 3)
pWP868	4,5	Ap	1,15 kb ClaI Fragment in pWP866 deletiert (diese Arbeit)
pWP869	4,25	Ap	1,4 kb ClaI Fragment in pWP867 deletiert (diese Arbeit)
pWP8661	4,3	Gm	1,3 kb PvuI Fragment in pWP866 deletiert (diese Arbeit)
pWP87	6,7	Tc Gm	2,3 kb PstI Fragment von pWP14a in pBR322/PstI kloniert (7,24)
pWP871	4,05	Gm	1,4 kb PstI/SalI Fragment von pBR322 durch 1,05 kb PstI/SalI Fragment von pWP87 ersetzt (diese Arbeit)

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Bezeichnung	Länge (kb)[a]	relevanter Phänotyp[a]	Herkunft und Referenz
pWP1133	6,35	Tc Gm	0,75 kb EcoRI/PstI Fragment von pBR322 durch 2,7 kb EcoRI/PstI Fragment von pWP113a ersetzt (W. Piepersberg, 25)
pWP11331	4,15	Gm	2,2 kb SalI Fragment in pWP1133 deletiert (W. Piepersberg, 25)
pWP1162	11,25	Ap Gm	0,65 kb EcoRI/SalI Fragment von pBR322 durch 7,5 kb EcoRI/SalI Fragment von pWP116a ersetzt (W. Piepersberg, 25)
pWP11625	4,1	Gm	7,0 kb PstI Fragment in pWP1162 deletiert (W. Piepersberg, 25)
pJOE104	14,6	Ap Km	10,2 kb BglII Fragment aus P1Km (26) in pBR322/BamHI kloniert (J. Altenbuchner, 27)
pBR322	4,4	Ap Tc	J. Davies (28)
pKC7	5,8	Ap Km	H. Hennecke (29)

[a] Verwendete Symbole: siehe Tabelle 3

Tabelle 5: Bakteriophagen

Bezeichnung	Herkunft und Referenz
M13mp7	J. Messing (19)
M13mp8, mp9	J. Messing (30)
M13mp10, mp11	BRL (Vieira und Messing, nicht veröffentlicht)
M13mp12	Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, England
λcI857 Sam7	Laborsammlung

II. Nährmedien (31)

LB-Medium setzte sich aus 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt und 0,5 % NaCl zusammen und diente als Standard-Vollmedium.
TGYE-Medium enthielt 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt und 0,2 % Glucose,
TGYES-Medium zusätzlich 1 % NaCl und 0,25 % WM-Salzlösung.
WM-Minimalmedium bestand aus einer Salzlösung aus 0,05 M Na_2HPO_4, 0,1 M KH_2PO_4, 0,0001 M $CaCl_2$, 0,001 M $MgSO_4$, 0,012 M $(NH_4)_2SO_4$, welche mit 0,2 % Glucose und 5 µg/ml Vitamin B1 supplementiert wurde.
M9-Minimalmedium enthielt 0,6 % Na_2HPO_4, 0,3 % KH_2PO_4, 0,05 % NaCl, 0,1 % NH_4Cl und 0,025 % $MgSO_4$. Nach dem Autoklavieren wurden 15 µg/ml $CaCl_2$, 5 µg/ml Vitamin B1 und 0,2 % Glucose steril zugegeben.
Für die Anzucht auxotropher Stämme wurden Minimalmedien mit jeweils 40 µg/ml der benötigten Aminosäure versetzt.
Feste Nährböden enthielten 1,5 % Agar, Weichagar zum Überschichten von Platten 0,8 %.
Zur Herstellung aller Medien wurde teilentsalztes Wasser verwendet.

Für Selektivmedien wurden LB-Nährböden Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugesetzt: Ampicillin: 100 µg/ml, Chloramphenicol: 20 µg/ml, Tetracyclin: 25 µg/ml, Gentamicin: 20 µg/ml, Kanamycin: 20 µg/ml und Hygromycin B: 200 µg/ml. ß-Galactosidasetestmedien enthielten 30 µg/ml X-Gal (5-Brom-4 chlor-indolyl-ß-D-galactosid) und 0,3 mM IPTG (Isopropyl-thiogalactosid) in LB-Weichagar.

III. Kulturbedingungen und Aufbewahrung von Bakterienstämmen

Kulturen bis 500 ml wurden in Erlenmeyerkolben geschüttelt, während die Anzucht im präparativen Maßstab in einem Biostat Fermenter (U50D, Braun Melsungen) erfolgte. Wachstumskurven wurden durch Messung der A_{420} mit Hilfe eines Hitachi-Photometers bestimmt. Plasmidhaltige E. coli Stämme wurden in Gegenwart eines geeigneten Antibiotikums kultiviert.

Die verwendeten Bakterienstämme wurden auf LB-Medien etwa alle drei Monate überimpft. Zur langfristigen Aufbewahrung bis über zwei Jahre wurden Glyzerinkulturen hergestellt. Dazu wurden 0,7 ml von über Nacht in LB-Medium angewachsenen Zellen in 1 ml Glyzerin suspendiert und nach dem Mischen bei - 20° C aufbewahrt.

IV. Genetische Methoden

1. Isolierung von Plasmid-DNS

Schnellpräparation von Plasmiden erfolgte nach der Methode von Kado und Liu (32) oder durch alkalische Lyse nach Ish-Horowicz et.al. (33). Für die präparative Gewinnung von Plasmid-DNS wurden Zellen in 1 bis 6 l LB-Medium unter Zusatz eines geeigneten Antibiotikums angezogen. Bei einer A_{420} von 0,7 wurde zur Amplifikation 50 µg/ml Chloramphenicol zugegeben und über Nacht weitergeschüttelt. Extraktion erfolgte nach der "cleared lysate" Methode (34) oder durch alkalische Lyse (33). Abtrennung chromosomaler DNS wurde durch zweimalige CsCl Dichtegradientenzentrifugation bei 100 000 g (40 bzw. 20 h) in einem 70,1 Ti Rotor (Beckman) erreicht (34).

2. Isolierung von Bakteriophagen-DNS

Zur Präparation von λ-DNS wurde E. coli H112 in 1 bis 10 l LB-Medium bei 30° C bis zu einer A_{546} von 0,7 angezogen, durch 20 Min. Temperaturerhöhung auf 43° C induziert und 3 - 4 h bei 37° C weitergeschüttelt. Nach Zentrifugation 10 Min. bei 6000 g wurden die Zellen in Lysepuffer suspendiert (10 mM Tris/HCl pH7,9, 0,1 M KCl, 0,1 mM EDTA) und durch zweimaliges Einfrieren und Auftauen lysiert. Der erhaltene Extrakt wurde nach Zugabe von 10 mM $MgCl_2$ und 5 µg/ml DNase zweimal je 10 Min. bei 15 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf einen Blockgradienten mit CsCl der Dichten 1,3; 1,5 und 1,7 g/cm³

aufgetragen und in einem AH627 Rotor (Du Pont de Nemours) 2 h bei 100 000 g zentrifugiert. Die isolierte Phagenbande wurde dreimal gegen TM-Puffer (10 mM Tris/HCl pH7,5, 10 mM $MgSO_4$) mit 0,5 M, 0,1 M bzw. 0,01 M NaCl dialysiert. DNS-Extraktion erfolgte 5 Min. bei 65° C in 0,5 % SDS. Proteine wurden durch 0,5 M KCl 20 Min. in Eis gefällt und 20 Min. bei 17 000 g abzentrifugiert. Die im Überstand enthaltene Phagen-DNS wurde gegen 10 mM Tris-acetat pH8,2 dialysiert und bei 4° C aufbewahrt.

Für die Isolierung doppelsträngiger M13-DNS wurden M13-Phagen in JM103 transduziert (30),von einem Einzelplaque auf ß-Galaktosidasetestnährmedium mit Hilfe einer Pasteurpipette in 25 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37° C geschüttelt. Mit je 10 ml dieser Kultur wurden 2 x 700 ml LB-Medium beimpft, in welchem JM103 bis zu einer A_{550} von 0,5 angewachsen war. Nach 4 h Schütteln bei 37° C wurden die Zellen 10 Min. bei 6000 g abzentrifugiert und doppelsträngige, zirkuläre M13-DNS nach der Methode von Clewell und Helinski (34) isoliert.

Einzelsträngige M13-DNS wurde nach der von Messing und Vieira (30) beschriebenen Methode präpariert.

3. Spaltung von Plasmid- oder Phagen-DNS mit Restriktionsendonukleasen, Isolierung von DNS-Fragmenten und Ligation mit T4-Ligase ("Klonierung")

Für die Spaltung mit Restriktionsendonukleasen wurde doppelsträngige Phagen- oder Plasmid-DNS nach Isolierung durch alkalische Lyse (33) oder CsCl Dichtegradientenzentrifugation (s. IV. 1; 34) verwendet. 1 bis 20 µg DNS-Material wurde in 25 bis 100 µl Ansätzen nach der

vom Hersteller empfohlenen Vorschrift mit Restriktionsendonukleasen verdaut und durch 15 Min. Inkubation bei 68° C oder durch Phenolextraktion inaktiviert. Bei Doppelverdauungen wurde jeweils die Hälfte des für ein Enzym beschriebenen Puffers eingesetzt, und mit zwei Enzymen gleichzeitig inkubiert. In einigen Fällen wurde zunächst mit einer Restriktionsendonuklease gespalten, und nach Phenolextraktion mit einem zweiten Enzym nachverdaut. Die erhaltenen Fragmente wurden auf 0,7 bis 1,2 % Agarosegelen aufgetrennt, für Klonierungsansätze oder für DNS-Sequenzierung nach Maxam-Gilbert (s.IV. 5,2; 35) eingesetzt.

Phenolextraktion erfolgte durch Zugabe desselben Volumens destilliertem 0,1 M Tris-gesättigtem Phenol pH8 zu wässrigen Lösungen. Nach Mischen und 10 Min. Zentrifugation bei 10 000 g wurde die wässrige Phase zweimal mit Chloroform ausgeschüttelt und nach Zusatz von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH7 mit dem dreifachen Volumen - 20° C kaltem Ethanol p.A. in einem Trockeneis/Ethanolgemisch mindestens 5 Min. gefällt. Der durch 15 Min. Zentrifugation bei 10 000 g erhaltene Überstand wurde vorsichtig abgehebert, und der Niederschlag mit - 20° C kaltem 70 % Ethanol p.A. gewaschen und 15 Min. bei 44° C in einer Vakuumzentrifuge (Bachhofer) getrocknet.

Isolierung von DNS-Fragmenten erfolgte durch Ausschneiden von mit Ethidiumbromid gefärbten Banden aus Agarosegelen, Überführen in Visking Dialyseschläuche (Porendurchmesser ca. 24 Å, Serva) und elektrophoretische Elution in TBE-Puffer (90 mM Tris,

90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA pH8,3) mindestens 6 h bei etwa 40 mA. Ablösen der DNS-Fragmente vom Dialyseschlauch wurde durch 10 sec Umpolen bei 40 mA erreicht. Nach Dialyse gegen deionisiertes Wasser wurde der Schlauchinhalt 10 Min. bei 10 000 g zentrifugiert. Der weitgehend von Gelstückchen befreite Überstand wurde in einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert.

Alternativ wurden DNS-Fragmente in 1 % "low-melting-temperature" Agarosegelen bei 8° C aufgetrennt. Die ausgeschnittenen Banden wurden 5 Min. bei 68° C im Wasserbad aufgeschmolzen und mit 0,1 M Tris-gesättigtem destilliertem Phenol pH8 extrahiert. Anschließend erfolgten Extraktionen mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) und Chloroform,und Fällung mit Ethanol (siehe oben).

Für Klonierungsansätze wurden äquimolare Mengen von mit Restriktionsendonukleasen gespaltener Vektor-DNS und Plasmid- oder Phagen-DNS bzw. isolierten DNS-Fragmenten zusammengegeben und nach der vom Hersteller empfohlenen Methode mit T4-Ligase bei 4° C über Nacht inkubiert. In einigen Fällen wurde Vektor-DNS vor Ligation mit alkalischer Phosphatase aus Kalbsthymus behandelt nach der Vorschrift des Herstellers. Ligierte DNS wurde in einen geeigneten Rezeptorstamm transformiert (siehe unten).

4. Transformation und Transfektion

E. coli C600 wurde für die Transformation nach der Methode von Cohen et.al. (36) in 20 ml LB-Medium bis zu einer A_{420} von etwa 1 angezogen. Die Zellen wurden

10 Min. bei 6000 g abzentrifugiert und in 10 ml eiskaltem TC-Puffer (10 mM Tris/HCl pH7,5, 75 mM $CaCl_2$) 20 Min. in Eis gestellt. Nach 10 Min. Zentrifugation bei 6000 g wurde das Zellsediment in 1 ml TC-Puffer aufgenommen. 0,2 ml dieser kompetenten Zellen wurden mit 1 bis 10 µg ligierten Plasmid-Fragmenten versetzt und 10 Min. in Eis inkubiert. Nach 3 Min. leichtem Schütteln bei 37° C wurden die Zellen 1,5 h in Eis gestellt. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium zugefügt und 30 Min. bis eine Stunde bei 37° C stark geschüttelt. 0,1 ml dieser Zellsuspension wurde auf Selektivmedium plattiert und über Nacht bebrütet. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Zugabe von Plasmid-DNS.

Für die Transfektion wurde JM103 in WM-Minimalmedium über Nacht angezogen. 0,9 ml dieser Kultur wurden in 50 ml LB-Medium überführt und bis zu einer A_{620} von 0,3 bei 37° C kultiviert. Nach 10 Min. Zentrifugation bei 6000 g wurden 20 ml eiskaltes 50 mM $CaCl_2$ zugegeben und die Zellsuspension 20 Min. in Eis gestellt. Nach 10 Min. Abzentrifugation bei 6000 g wurden die Zellen in 2 ml 50 mM $CaCl_2$ suspendiert und 20 Min. in Eis gestellt. 0,3 ml dieser kompetenten Zellen wurden mit etwa 1 µg einzel- oder doppelsträngiger M13-DNS 3 Min. bei 43° C inkubiert und mit 0,2 ml einer JM103-Kultur der A_{620} von 0,3 in ß-Galactosidase-testmedium bei 37° C bebrütet. Von den erhaltenen weißen Plaques wurde einzelsträngige DNS isoliert und in einigen Fällen durch erneute Transfektion in JM103 gereinigt.

5. DNS-Sequenzierung

5.1 Didesoxynukleotidmethode nach Sanger (37)

DNS-Sequenzierung erfolgte vorwiegend nach der Methode von Sanger (37). Dazu wurden DNS-Fragmente aus Plasmiden in doppelsträngige DNS der M13-Phagen mp7, mp8, mp9, mp10, mp11 oder mp12 kloniert und in JM103 transformiert (19). Aus weißen Einzelplaques isolierte einzelsträngige DNS wurde durch einen einzigen Reaktionsansatz mit ddTTP vorgetestet (sog. "T-screening"). Das Auffinden spezifischer Klone erfolgte durch Hybridisierung mit einzel- oder doppelsträngiger DNS (s. IV. 7; 38). Auf diese Weise analysierte M13-Klone wurden für die DNS-Sequenzierung nach Sanger eingesetzt (37). Markierung erfolgte mit 10 µCi α-^{32}P -dATP einer spezifischen Radioaktivität von 800 Ci/mmol (Amersham-Buchler). Die erhaltenen Fragmente wurden durch Gelelektrophorese in 6 % Polyacrylamid und 8 M Harnstoff aufgetrennt.

5.2 Chemische Spaltung nach Maxam und Gilbert (35)

Für die DNS-Sequenzierung nach Maxam und Gilbert (35) wurden mindestens 10 µg Plasmid-DNS mit einem Restriktionsenzym gespalten und nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus Kalbsthymus am 5'Ende mit Polynukleotidkinase und 50 µCi von γ-^{32}P -ATP einer spezifischen Radioaktivität von 7000 Ci/mmol (NEN) markiert. Nach Nachschneiden mit einem zweiten Restriktionsenzym wurden die erhaltenen Fragmente auf 1 % "low-melting-temperature" Agarosegelen aufgetrennt. Isolierte Banden wurden für basenspezifische Spaltungsreaktionen nach

Maxam und Gilbert (35) eingesetzt. Für (A+G)-spezifische Reaktionen wurde 66 % Ameisensäure, 2 % Diphenylamin und 1 mM EDTA nach Gray et.al. (39) verwendet. Die erhaltenen Fragmente wurden durch Gelelektrophorese in 6 %, 8 % und 20 % Polyacrylamid mit 7 M Harnstoff aufgetrennt.

6. Gelelektrophoretische Methoden zur Auftrennung von DNS-Fragmenten und Plasmid-DNS

6.1 Agarosegelelektrophorese

1 bis 10 µg DNS-Material wurde in 50 % Glyzerin und 0,02 % Bromphenolblau auf horizontalen 0,7 % bis 1,2 % Agarosegelen aufgetrennt. Als Laufmittel wurde TBE (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA, pH8,3) oder TAE (40 mM Tris, 10 mM Na-acetat, 1 mM EDTA, pH7,8) verwendet. Die Ausmaße der verwendeten Gele betrugen 5,6 x 7,6 x 0,3 cm bis 16 x 16 x 0,7 cm. Die angelegte Stromstärke lag entsprechend zwischen 30 und 40 mA. Sobald Bromphenolblau das untere Drittel des Geles erreichte, wurde die Elektrophorese beendet. Nach Anfärbung mit ca. 0,3 ml 10 mg/ml Ethidiumbromid wurden die DNS-Banden unter dem UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht und mit einer Polaroidkamera unter Verwendung eines dunkelroten Glasfilters (Heliopan Nr. 29) fotographiert. Als Molekulargewichtsstandard wurde mit HindIII verdaute λ-DNS oder mit geeigneten Enzymen gespaltene pBR322-DNS mit aufgetrennt.

1 % "low-melting-temperature" Agarosegele wurden bei 8° C hergestellt. Elektrophorese erfolgte bei 30 mA etwa 3 bis 4 h in TBE-Puffer.

6.2 Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese

Gelelektrophorese für die DNS-Sequenzierung erfolgte in 6 %, 8 % oder 20 % Polyacrylamid mit 7M oder 8M Harnstoff in TBE-Puffer. Die angelegte Stromstärke betrug ca. 30 mA. Teilweise wurden auf 65° C thermostatisierte Apparaturen verwendet. Das Ausmaß der Gele war 59 x 17 x 0,3 oder 0,1 cm. Bromphenolblau und Xylengrün dienten zur Markierung bei der Auftrennung. Die Gele wurden nach beendeter Elektrophorese auf Whatman 3MM Filterpapier übertragen und bei 60° C im Vakuum getrocknet. Alternativ wurden an silanisierte Glasplatten gebundene Gele nach Fixieren mit 10 % Essigsäure und Besprühen mit 10 % Glyzerin bei 80° C an Luft getrocknet. Zur Autoradiographie wurden Kodak X-Ray90 Filme verwendet.

7. DNS/DNS-Hybridisierungsmethoden

Aus weißen Einzelplaques isolierte einzelsträngige M13-Hybridphagen-DNS wurde in regelmäßigen Abständen auf Nitrozellulosefilter aufgetragen und nach der von Hu und Messing (38) beschriebenen Methode behandelt. Hybridisierung erfolgte mit α-^{32}P -dATP-markierter M13-DNS (38) oder mit nach Maniatis et.al. (40) durch sog. "nick-translation" markierter Plasmid-DNS.

Durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennte DNS-Fragmente wurden nach der Methode von Southern (41) auf Nitrozellulose übertragen und mit nach Maniatis (40) α -^{32}P -dATP- markierten Plasmidfragmenten hybridisiert (41).

8. Computerprogramme

Zuordnung der nach der Methode von Sanger (37) erhaltenen DNS-Sequenzen erfolgte mit Hilfe des von Messing erhaltenen Programmes (Version 2.1, 42). Außerdem wurde dieses Programm für das Auffinden von Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen verwendet sowie für das Übersetzen des DNS-Codes in Aminosäuresequenzen. Homologievergleiche von DNS- und Proteinsequenzen erfolgten vorwiegend mit dem von Zweig (43) veröffentlichten Programm. Diese Arbeiten wurden an einem Apple II Computer in Pascal durchgeführt.

Mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Foertsch konnten am Rechenzentrum des Max Planck Institutes für Biochemie in Martinsried Proteinsequenzen mit Hilfe der Programme DIAGON, ALIGN, RELATE und SEARCH verglichen werden. Darüber hinaus wurden wahrscheinliche Sekundärstrukturen aus Aminosäuresequenzen ermittelt nach den von Robson (44) und Chou-Fasman (45) vorgeschlagenen Berechnungsgrundlagen.

V. Proteinchemische Methoden

1. Reinigung der Aminoglykosid-(3)-N-Acetyltransferase IV

1.1 Anzucht und Aufschluß der Zellen

Für die Anreicherung des AAC(3)-IV Enzyms wurde ein E. coli C600 Stamm, welcher das Plasmid pWP701 enthielt, in 81 TGYES Medium mit 10 µg/ml Gentamicin in einem Braun Biostat U50D Fermenter bei 37° C bis zu einer A_{420} von 8 angezogen. Nach Ernte der Zellen in einer Durchlaufzentrifuge und Waschen mit TMNSH-Puffer (20 mM Tris/HCl pH7,5, 10 mM $MgCl_2$, 30 mM NH_4Cl, 6 mM 2-Mercaptoethanol) wurden die mit ca. 100 ml desselben Puffers resuspendierten Zellen mit 1 µg/ml DNase versetzt und bei 16 000 psi in einer French Pressure Zelle (American Instruments Company) aufgebrochen. Enzymhaltige Extrakte wurden im folgenden ausschließlich bei 0° C bis 8° C gehandhabt.

1.2 Präparation eines ribosomenfreien Extraktes (S100)

Der aus Punkt 1.1 gewonnene Rohextrakt wurde 30 Min. bei 30 000 g in einem SS34 Rotor (Du Pont de Nemours) zentrifugiert. Der Überstand (S30) wurde anschließend 2,5 h bei 100 000 g in einem 70,1 Ti Rotor (Beckman Instruments) zentrifugiert. Der ribosomenfreie Überstand (S100) wurde mit 1 µg/ml RNase versetzt und 15 Min. bei 37° C inkubiert.

1.3 Ammoniumsulfatfällung

Zur Konzentrierung wurde der S100 Extrakt mit Ammoniumsulfat in einer Endkonzentration von 65 % bei 0° C gefällt. Der nach einer Stunde gebildete Niederschlag wurde 15 Min. bei 30 000 g im SS34 Rotor zentrifugiert, in ca. 30 ml 10 mM Tris/HCl pH7,6 suspendiert und gegen 10 mM Tris/HCl pH7,6 dialysiert. Nicht gelöste Rückstände wurden abzentrifugiert, und der klare Überstand weiterverwendet.

1.4 Affinitätschromatographie

Für Affinitätschromatographie wurden 500 mg Tobramycin an 6 g mit Hydroxysuccinimid aktivierte CH-Sepharose (Pharmacia) nach der vom Hersteller empfohlenen Vorschrift kovalent gekoppelt und mit 10 mM Tris/HCl pH7,6 äquilibriert (Säulenmaße: 0,7 x 25 cm; Flußrate: 10 ml/h). Das nach Punkt 1.3 erhaltene Dialysat wurde auf die Säule aufgetragen, und solange mit 10 mM Tris pH7,6 nachgewaschen, bis im Eluat kein Protein mehr nachgewiesen werden konnte. Fraktionen zu je 55 Tropfen (ca. 2,3 ml) wurden gesammelt. Elution erfolgte zunächst mit 100 mM Ammoniumsulfat in 10 mM Tris/HCl pH7,6/0,1 mM EDTA und anschließend mit 5 ml 20 mg/ml Gentamicin (C-Komplex) in 10 mM Tris/HCl pH7,6. Nach Waschen mit 10 mM Tris/HCl pH7,6 wurde das Säulenmaterial mit 2 M NH_4Cl in 10 mM Tris/HCl pH7,6 regeneriert und in 0,05 % α,α,α-Trichlor-tertiär-butylalkohol (Fluka) in 10 mM Tris/HCl pH7,6 bei 8° C aufbewahrt. Nach Ammoniumsulfatelution erhaltene Fraktionen wurden vereint, gegen 10 mM Tris/HCl pH7,6 dialysiert und wie bereits beschrieben auf einer weiteren Tobramycin Sepharose Säule aufgetrennt. Die von beiden Säulen mit Gentamicin eluierten Fraktionen wurden zusammen gegen destilliertes Wasser dialysiert, portionsweise lyophilisiert und bei - 20° C aufbewahrt.

2. Aminoglykosid-Acetyltransferasetest

Zur Bestimmung der Aminoglykosid-(3)-N-Acetyltransferase-aktivität wurde die von Beneviste und Davies (46) beschriebene Methode in etwas abgeänderter Form verwendet. Dieser Test beruht auf der in vitro Synthese von ^{14}C -Acetyl-(3)-N-Aminoglykosid, das an Phosphozellulose-filter gebunden wird und auf diese Weise von freiem 1- ^{14}C -AcetylCoA abgetrennt werden kann. Ein Standard-enzymtest enthielt Testpuffer (50 mM Tris/HCl pH7,0, 0,2 mM $MgCl_2$, 10 mM NH_4Cl, 1 mM Dithiothreitol, 500 µg/ml BSA), 71 µM 1- ^{14}C - AcetylCoA (10 µ Ci/µmol), 95 µM Gentamicin. 25 µl dieses Reaktionsgemisches wurden auf 30° C vortemperiert, und 10 µl der zu testenden Enzym-lösung in geeigneter Verdünnung (bis zu 10^{-4}, in Test-puffer) zugegeben. Inkubation erfolgte nach Mischen 2 Min. bei 30° C. Nach Abstoppen der Reaktion durch rasches Abkühlen in Eiswasser wurden sofort 30 µl des Ansatzes auf ca. 1 cm^2 Phosphozellulosefilter (Whatman) transferiert und 30 Min. bei 60° C getrocknet. Über-schüssiges 1- ^{14}C -AcetylCoA wurde durch Waschen mit 60° C heißem Wasser und anschließend mit kaltem voll-entsalztem Wasser entfernt. Nach einer Stunde Trocknen bei 80° C wurde an den Filter gebundene Radioaktivität in 5 ml 0,5 % PPO in Toluol in einem Flüssigkeits-szintillationszähler (Kontron) bestimmt. Als Kontrolle dienten 30 µl Reaktionsgemisch ohne Zugabe von Enzym. Die mit diesem Ansatz gemessene filtergebundene Radioakti-vität wurde von allen anderen Werten subtrahiert. Bei der Bestimmung der Substratabhängigkeit der Enzymaktivität wurde eine weitere Kontrolle ohne Aminoglykosidsubstrat durchgeführt.

3. Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen einzelner Säulenfraktionen wurden während der Elution durch Messung der A_{280} mit einem Durchflußphotometer (LKB Uvicord S) bestimmt in Verbindung mit einem Flachbettschreiber (LKB 2210). Proteinbestimmung vereinigter Fraktionen erfolgte nach der von Lowry (47) beschriebenen Methode.

4. Gelelektrophoretische Methoden zur Auftrennung von Proteinen

4.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (48)

Zu 10 µl einer Proteinlösung wurden 20 µl Puffer zugegeben (62,5 mM Tris/HCl pH6,8, 2 % SDS, 5 % 2-Mercaptoethanol, 10 % Glyzerin, 0,001 % Bromphenolblau). Nach 5 Min. Kochen wurden die Proben 1 Min. bei 10 000 g abzentrifugiert und auf 11,5 % bis 15 % Polyacrylamidgelen mit 0,1 % SDS aufgetragen und nach der von Laemmli (48) beschriebenen Methode aufgetrennt. Ein Gemisch aus folgenden Standardproteinen (BRL) wurde ebenfalls aufgetrgen: Lysozym (14,4 kd), Sojabohnen Trypsin Inhibitor (21,5 kd), Carbonische Anhydrase (31 kd), Ovalbumin (45 kd), Rinderserumalbumin (66,2 kd) und Phosphorylase B (92,5 kd). Das Molekulargewicht unbekannter Proteine wurde aus einer semilogarithmischen Auftragung (Wanderungsstrecke gegen Molekulargewichte) ermittelt. Die Abmessung der Gele betrug 16,5 x 13 x 0,2 cm. Zum Anfärben der Proteine wurde 0,2 % Coomassie in Methanol/Eisessig/Wasser im Verhältnis 3 : 1 : 6 verwendet, oder bei sehr geringen Proteinkonzentrationen im Gel Silberfärbungsreagenzgemisch (BioRad).

4.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese nach O'Farrell (49)

E. coli Stämme wurden bei 37° C in 10 ml WM-Salzlösung angezogen mit 0,4 % Glucose, 5 µg/ml Vitamin B1, 40 µg/ml Threonin, 40 µg/ml Leucin, 0,5 µg/ml Methionin und 5 µCi/ml ^{35}S -Methionin. Die A_{420} wurde in einer Parallelkultur ohne ^{35}S -Methionin bestimmt. Bei A_{420} von etwa 1 wurde eiskalte Trichloressigsäure in einer Endkonzentration von 10 % zugegeben. Nach 10 Min. Zentrifugation bei 12 000 g wurde das Präzipitat mit 25 ml - 20° C kaltem Aceton p.A. gewaschen und eine Stunde in Eis gestellt. Nach 10 Min. Zentrifugation bei 12 000 g wurde der Niederschlag im Exikkator getrocknet, in 100 µl Puffer (100 mM Tris/HCl pH7,4, 0,05 M $MgCl_2$) suspendiert und in einem Eppendorf-reaktionsgefäß beschallt (Branson Sonifier Typ B 15). Die erhalenen Extrakte wurden mit je 40 µg/ml DNase und RNase versetzt und 20 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Pro 1 µl Extrakt wurden 0,9 mg Harnstoff zugegeben und nach Mischen mit je 2 µl Lysispuffer versetzt (9,5 M Harnstoff, 2 % Nonidet P-40, 5 % 2-Mercaptoethanol, 4 % Ampholine pH5-7, 1 % Ampholine pH3-10). 1 µl dieses Gemisches diente der Bestimmung des Einbaus von ^{35}S -Methionin nach Fällung mit eiskalter 10 % Trichloressigsäure in Gegenwart von 10 µg BSA. 0,2 bis 0,4 µCi markierten Extraktes wurden für die von O'Farrell (49) beschriebene gelelektrophoretische Auftrennung verwendet. Nach Anfärbung mit Coomassie wurden die Gele bei 60° C im Vakuum getrocknet und mit einem Kodak X-Omat (XAR-5) Röntgenfilm ein bis 14 Tage exponiert.

5. Partielle Proteolyse von Proteinen mit Staphylococcus aureus V8 Protease

Partielle Proteolyse von Proteinen mit Staphylococcus aureus V8 Protease wurde nach der von Cleveland (50) beschriebenen Methode durchgeführt. Dazu wurden Proteinlösungen durch eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Nach Anfärbung mit Coomassie wurden die zu untersuchenden Banden ausgeschnitten, zusammen mit 1 bis 5 ml Puffer (0,3 % Tris, 1,44 % Glycin, 0,1 % SDS) in einen Dialyseschlauch überführt und in demselben Puffer in einem elektrischen Feld 6 h bei 80 V eluiert. Ablösung der Proteine vom Dialyseschlauch erfolgte durch Umpolung 10 sec bei 60 mA. Nach Dialyse gegen vollentsalztes Wasser wurde der Schlauchinhalt 10 Min. bei 10 000 g zentrifugiert, der von Polyacrylamidresten weitgehend befreite Überstand lyophilisiert, in 50 µl Puffer aufgenommen (0,125 M Tris/HCl pH6,8, 0,5 % SDS, 10 % Glyzerin), 2 Min. gekocht und in Eis abgekühlt. Nach Zusatz von 0,05 bis 0,5 µg Staphylococcus aureus V8 Protease erfolgte 30 Min. Inkubation bei 37° C. Durch 2 Min. Kochen wurde die Reaktion abgestoppt. Die erhaltenen Peptidfragmente wurden durch eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und mit Silberfärbungsreagenzgemisch (BioRad) angefärbt.

6. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz

Das durch Affinitätschromatographie gereinigte AAC(3)-IV Enzym wurde gegen 70 % Essigsäure dialysiert und anschließend gegen 5 % Essigsäure. 10 bis 20 nMol wurden in Glasgefäße mit Schliffstopfen überführt und lyophilisiert. Die Bestimmung der N-terminalen Amino-

säuresequenz wurde mit der von Chang et.al.(51) beschriebenen Methode durchgeführt. Bei jedem Sequenzierschritt wurde zunächst 4-NN-Dimethylaminoazobenzen 4'- isothiocyanat (DABITC) und anschließend Phenylisothiocyanat (PITC) zur Kopplung an das Protein verwendet. Das Thiocarbamylderivat der N-terminalen Aminosäure wurde mit 100 % Trifluoressigsäure abgespalten und mit 50 % Trifluoressigsäure zur Thiohydantoin-Aminosäure (DABTH-Aminosäure) konvertiert.

Identifizierung der DABTH-Aminosäuren erfolgte durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie mit 2,5 x 2,5 cm Micropolyamidfolien (Schleicher & Schüll). Als Laufmittel wurde Eisessig/Wasser (1 : 2) in der ersten Dimension verwendet und Toluol : n Hexan : Eisessig (2 : 1 : 1) in der zweiten Dimension. Als Referenz wurde gleichzeitig DABTC-Diethylamin aufgetragen. Durch Behandlung der Folien mit HCl-Dampf erschienen DABTH-Aminosäuren als rötliche Flecken im Gegensatz zum blauen DABTC-Diethylamin. Ein violett gefärbtes Reaktionsprodukt aus PITC und DABITC diente als zusätzlicher Vergleichspunkt. Identifizierung der DABTH-Aminosäuren erfolgte mit Hilfe des von Chang (51) veröffentlichten Schemas.

7. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration

Das Molekulargewicht des nativen AAC(3)-IV Enzyms wurde durch Gelfiltration an einer Sephacryl S300 Säule nach der von Andrews (52) beschriebenen Methode bestimmt (Säulenmaße: 2,5 x 120 cm; Laufpuffer: 0,1 M KH_2PO_4/K_2HPO_4 pH7,5; Flußrate: 23 ml/h;

Fraktionsvolumen: 2,3 ml). Folgende Eichproteine wurden ebenfalls aufgetrennt: Katalase (240 kd), Lactatdehydrogenase (134 kd), Rinderserumalbumin (66 kd), Albumin aus Hühnerei (45 kd) und Cytochrom c (12,5 kd). Katalase und Lactatdehydrogenase wurden durch Aktivitätstests nachgewiesen (53), während Cytochrom c durch Messung der A_{450} bestimmt wurde. Das Molekulargewicht des nativen AAC(3)-IV Enzyms wurde aus einer semilogarithmischen Auftragung (Wanderungsstrecke gegen Molekulargewichte) ermittelt.

VI. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) durch Plattenverdünnungstests

E. coli Stämme wurden in 2,5 ml TGYE Medium bis zu einer A_{420} von 1 angezogen. Von diesen Kulturen wurde mit einer Impföse auf TGYE Platten ausgestrichen, die 0; 1,6; 3,1; 6,2; 12,5; 25; 50; 100; 200 und 400 µg/ml des zu untersuchenden Antibiotikums enthielten. Aus zwei Parallelansätzen wurde jeweils die minimale Hemmkonzentration (MHK) eines Antibiotikums ermittelt, welche das Wachstum des getesteten Stammes gerade noch hemmte.

VII. Enzyme und Chemikalien

Restriktionsendonukleasen, DNS-PolymeraseI (Holoenzym und Klenow Fragment), T4-Ligase, alkalische Phosphatase aus Kalbsthymus, Polynukletidkinase, Laktatdehydrogenase aus Kaninchenmuskel, Katalase aus Rinderleber und Cytochrom c wurden von Boehringer-Mannheim bezogen. Staphylococcus aureus V8 Protease und Lysozym waren von Sigma.

α-^{32}P -dATP, ^{35}S -Methionin und 1-^{14}C -AcetylCoA wurden von Amersham-Buchler geliefert, γ-^{32}P -ATP von NEN. Nukleotide, Didesoxynukleotide und AcetylCoA waren von Boehringer-Mannheim, Oligonukleotidprimer von BioLabs.

Antibiotika wurden von folgenden Herstellern erhalten: Gentamicin (C-Komplex) und Ampicillin: Sigma, Tetracyclin: Boehringer-Mannheim, Chloramphenicol, Neomycin und Kanamycin: Serva, Sisomicin: Bayer, Tobramycin, Apramycin und Hygromycin B: Eli Lilly Corp., G418, Gentamicine C1, C1a und C2, Netilmicin: Schering Corp., Paromomycin: Park-Davis.

Chemikalien für die Proteinchemie waren ebenso wie Phenol nach den beschriebenen Empfehlungen ein- bis zweimal destilliert. Alle anderen Feinchemikalien waren vom Reinheitsgrad p.A.

C. E R G E B N I S S E

I. Analyse von aacC3 Genen

1. Physikalische Kartierung AAC(3)-III kodierender Plasmide und Lokalisation von Antibiotika-Resistenzgenen und IS140

Die Gentamicin-Resistenz kodierenden Plasmide pWP12a, pWP14a, pWP113a und pWP116a stammten aus verschiedenen in der Klinik isolierten gramnegativen Bakterien (s. Tab. 3) und wurden im folgenden näher untersucht. Physikalische Kartierungen von pWP113a und pWP116a waren bereits bekannt (25), ebenso wie die Lage der Antibiotika-Resistenzgene auf diesen Plasmiden. Restriktionskartierung des Plasmids pWP14a, das sich als mit pWP12a identisch erwies (7, 24), wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Enzyme BstEII und PvuI erweitert (s. Abb. 2).

Die genannten Plasmide kodierten jeweils für ein AAC(3)-III Enzym (1) und eine ß-Lactamase, das Plasmid pWP116a zusätzlich für Resistenz gegen Streptomycin und Spectinomycin. Die Ampicillin-Resistenzgene dieser Plasmide wiesen einige für das Transposon Tn3 charakteristische Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen auf (54). Durch DNS/DNS-Hybridisierung mit dem α-^{32}P-dATP-markierten 0,76 kb EcoRI/PstI-Fragment aus pBR322 (24, 55) wurde das Vorliegen einer Tn3 homologen Struktur in dem Plasmid pWP14a bestätigt. Darüber hinaus konnte Transposition der Ampicillin-Resistenzdeterminante von pWP14a in das Prophagengenom von P1Cm gezeigt werden (7, 24).

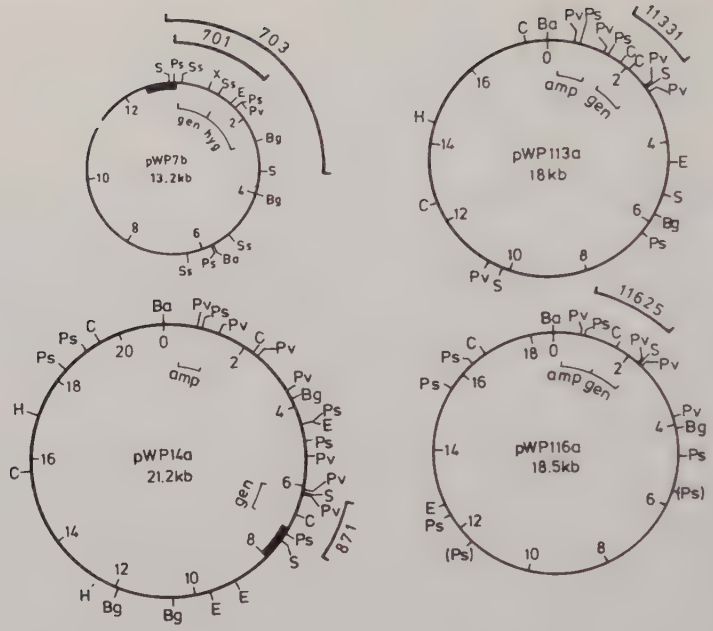

Abbildung 2:

Restriktionskarten der Gentamicin-Resistenz kodierenden Plasmide pWP7b, pWP14a, pWP113a und pWP116a.
Das Plasmid pWP7b kodiert ein AAC(3)-IV Enzym, die Plasmide pWP14a, pWP113a und pWP116a ein AAC(3)-III Enzym. Die durch Balken gekennzeichneten Fragmente wurden in den Vektor pBR322 kloniert, so daß die verkleinerten, Gentamicin-Resistenz kodierenden Hybridplasmide pWP701, pWP703, pWP11331, pWP871 und pWP11625 entstanden (s. Tab. 4).
Verwendete Symbole: gen = Gentamicin-Resistenzgen; hyg = Hygromycin B-Resistenzgen; amp = Ampicillin-Resistenzgen; ausgefüllter Balken = IS140; Ba = BamHI; Bg = BglII; C = ClaI; E = EcoRI; H = HindIII; Ps = PstI; Pv = PvuI; S = SalI; Ss = SstI; X = XhoI; (Ps), d.h. eine PstI Erkennungsstelle liegt an einer der zwei möglichen, eingezeichneten Positionen.

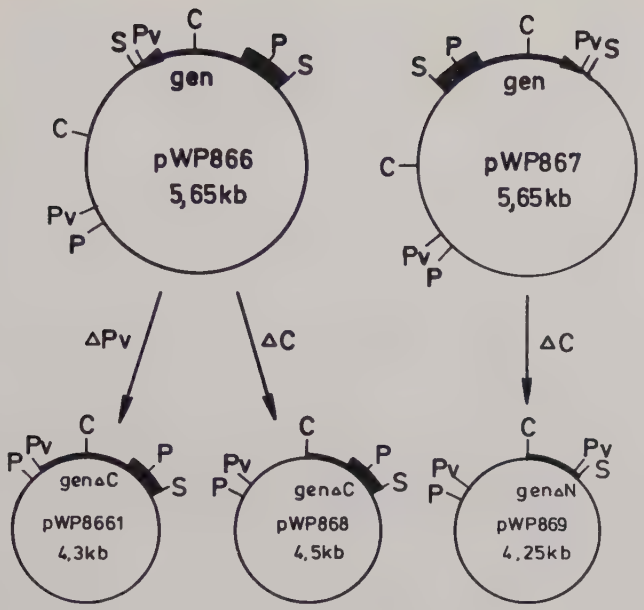

Abbildung 3:

Restriktionskarten der Plasmide pWP866, pWP867, pWP868 und pWP869.
Verwendete Symbole: Dicke Linien = aus pWP14a klonierte Fragmente (s. Tab. 4 und Text); dünne Linien = Vektor-DNS (pBR322); das Gentamicin-Resistenzgen (gen) wird in der durch einen Pfeil angegebenen Richtung transkribiert; ausgefüllter Balken = rechtes Ende von IS140 (0,4 kb); gen = Gentamicin-Resistenzgen (aacC3); gen Δ N(C) = für den N(C)-terminalen Teil des AAC(3)-III Enzyms kodierende DNS-Segmente sind deletiert;
weitere Symbole: s. Abb. 1

Das Gentamicin-Resistenzgen des Plasmids pWP14a wurde durch Klonierung verschiedener Restriktionsfragmente in pBR322 lokalisiert. Wie aus Tabelle 4 und Abb. 2 und 3 zu ersehen ist, kodierten die Hybridplasmide pWP85, pWP86, pWP866, pWP87, pWP871 und pWP8661 u.a. für Gentamicin-Resistenz. Expression in Minizellen ergab, daß von dem Plasmid pWP8661 ein Fusionsprotein von 43 kd gebildet wurde, während die Plasmide pWP871 und pWP866 das für das AAC(3)-III Enzym charakteristische Protein von 31,5 kd kodierten (s. I. 2 und Abb. 5). Das aacC3 Gen war folglich auf dem 1,05 kb PstI/SalI Fragment des Plasmids pWP14a lokalisiert. Restriktionskartierung der aacC3 Gene von pWP113a und pWP116a ergab ähnliche Muster wie für pWP14a gezeigt (s. Abb. 4). Die Homologie der aacC3 Gene dieser drei Plasmide wurde durch DNS-Sequenzierungsergebnisse von R. Allmansberger bestätigt (56).

In dem Plasmid pWP14a war ein neuartiges transponierbares Element, IS140, nachgewiesen worden (7, 24), welches durch je eine Erkennungsstelle für PstI und SalI charakterisiert war, 820 bp umfaßte und vorwiegend Kointegrate mit anderen DNS-Molekülen bildete. Aus Restriktionskartierungen und DNS/DNS-Hybridisierungsstudien (nicht gezeigt) ergab sich, daß die Plasmide pWP113a und pWP116a kein oder zumindest kein vollständiges IS140 Element enthielten.

Das nicht konjugierbare Plasmid pWP14a erwies sich als kompatibel mit pWP116a sowie einer Vielzahl von R-Plasmiden (7, 24; W. Piepersberg, persönl. Mitteilung). Die Plasmide pWP14a, pWP113a und pWP116a

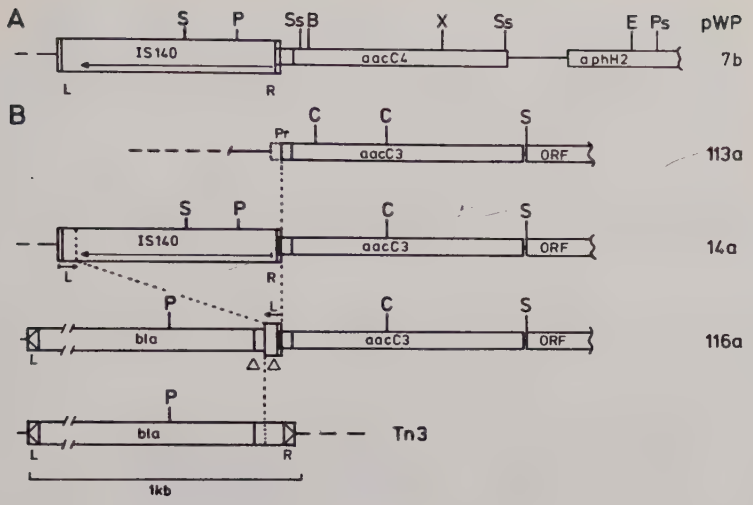

Abbildung 4:

Restriktionskarten der Gentamicin-Resistenz kodierenden Regionen der Plasmide pWP7b(A), pWP113a, pWP14a und pWP116a(B).
Die Lage und maßstabsgetreue Größe assoziierter Gene und transponierbarer Elemente ist angedeutet (s. Text). Die gepunkteten Linien verbinden diejenigen Stellen, an denen die einzelnen genetischen Einheiten durch Rekombination miteinander fusioniert wurden, z.B. durch Deletionen (Δ) von IS140 und Tn3 in pWP116a (56). Die Orientierung des linken Ende (L) des defekten IS140 Elementes in pWP116a ist durch einen kurzen Pfeil angegeben. Die 14 bp bzw. 38 bp invertiert wiederholten Sequenzen von IS140 bzw. Tn3 sind durch eine senkrechte Linie bzw. ein Dreieck angedeutet.
Die Transkriptionsrichtung des in IS140 vorhandenen offenen Leserahmens (702 bp; 9) wurde durch einen langen Pfeil angegeben.
Verwendete Symbole: L(R) = linkes (rechtes) Ende von IS140 bzw. Tn3; aacC3, aacC4, aphH2, bla = Gene für AAC(3)-III, AAC(3)-IV, APH(4) und ß-Lactamase; ORF = offener Leserahmen (mind. 276 bp); Pr = Promotor; B = BstEII, P = PstI; weitere Symbole: s. Abb. 2

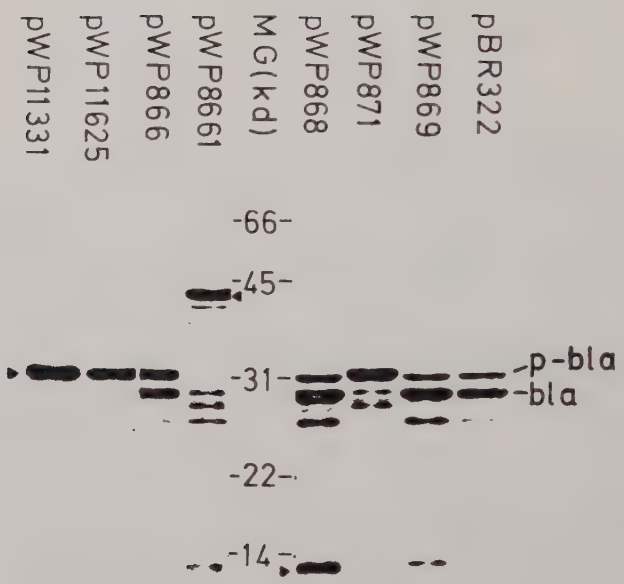

Abbildung 5:

Expression von aacC3-Plasmiden in Minizellen. Die Konstruktion und Herkunft der Plasmide ist oben beschrieben (s. Tab. 4 und Abb. 2, 3). p-bla und bla entsprechen der Vorläuferform bzw. dem reifen Protein der pBR322 kodierten ß-Lactamase, deren Molekulargewichte von 31,5 kd und 28,9 kd bekannt waren (55). Die Plasmide pWP11331, pWP11625, pWP8661 und pWP871 enthielten keine intakten ß-Lactamasegene. Die mit Pfeilen angegebenen Produkte entsprechen Proteinen von 12 kd, 31,5 kd und 43 kd.

unterschieden sich bezüglich Größe, Restriktionsmuster, getesteten Inkompatibilitätseigenschaften und Anordnung der Resistenzgene relativ zueinander, wiesen jedoch homologe aacC3 und bla Gene auf (s. Abb. 2 und Abb. 4)

2. Expression von aacC3 Genen in Minizellen, und Nachweis der Transkriptionsrichtung im Fall von pWP14a

Die Gentamicin-Resistenz kodierenden Plasmide pWP871, pWP866, pWP11331 und pWP11625 (s. Tabelle 4 und Abb. 2) wurden in den Minizellen bildenden Stamm DS410 transformiert. In isolierten Minizellen wurde jeweils ein Genprodukt von etwa 31,5 kd gebildet (s. Abb. 5). Expression des Plasmids pWP8661 in Minizellen ergab ein Protein von 43 kd, welches durch Fusion der aacC3 und bla Gene entstanden war. Für die Ablesung des aacC3 Gens von pWP14a wurde folglich derselbe Leserahmen verwendet wie für das bereits sequenzierte bla Gen des Vektorplasmids pBR322 (55). Darüber hinaus konnte geschlossen werden, daß das Translationsterminationssignal, das sog. "Stopcodon", des aacC3 Gens in dem 0,06 kb PvuI/SalI Fragment des Plasmids pWP871 lokalisiert war.

Genprodukte der beiden Plasmide pWP868 und pWP869 (s. Tab. 4 und Abb. 3), welche jeweils einen Teil des aacC3 Gens von pWP14a enthielten, sollten einen Hinweis auf die Transkriptions- und Translationsrichtung ergeben. Wie in Abbildung 5 gezeigt,wurde im Fall des Plasmids pWP868 ein Peptid von etwa 12 kd nachgewiesen, während von pWP869 neben der pBR322 kodierten ß-Lactamase kein weiteres Produkt gebildet wurde. Das N-terminale

Ende des AAC(3)-III Enzyms war folglich auf dem 0,75 kb SalI/ClaI Fragment von pWP868 kodiert. Ablesung des aacC3 Gens in pWP14a erfolgte proximal von IS140 in Richtung der einzigen ClaI Erkennungsstelle des aacC3 kodierenden Fragmentes.

3. DNS-Sequenzierung der Promotorregion des aacC3 Gens des Plasmids pWP14a und des rechten Endes von IS140

DNS-Sequenzierung der IS140 proximalen Region des aacC3 Gens von pWP14a sollte zeigen, ob eine charakteristische Promotorstruktur in diesem Bereich vorlag. Wie aus Abbildung 6A hervorgeht, wurde am 5' Ende des aacC3 Gens von pWP14a eine für E. coli charakteristische Promotorstruktur (57) nachgewiesen. Die hexameren Sequenzen $^{5'}\underset{TTGCAA}{\overset{-35}{}}{}^{3'}$ und $^{5'}\underset{TATAGT}{\overset{-10}{}}{}^{3'}$ im Abstand von 17 bp stimmten gut mit der Consensus Sequenz überein (57). Eine mögliche Ribosomenerkennungsstelle der Sequenz $^{5'}GGAG^{3'}$ (58) lag im Abstand von 8 bp vor einem möglichen Initiationscodon (ATG). Inzwischen wurde die DNS-Sequenz des aacC3 Gens vollständig ermittelt (56). Daraus ergab sich ein offener Leserahmen von 858 bp, das entsprach einem Genprodukt von 30,5 kd (286 Aminosäuren).

Die gezeigte Promotorstruktur für das aacC3 Gen des Plasmids pWP14a könnte Teil des benachbarten IS140 Elementes sein. Um dies zu überprüfen, wurde die in dieser Arbeit als rechtes Ende bezeichnete PstI proximale DNS-Sequenz von IS140 bestimmt. Dazu wurden die drei Plasmide pWP14a, pWP7b und pJOE104 verwendet, die außer IS140 keine gemeinsamen Strukturmerkmale besaßen (s. Tab. 3, 4 und Abb. 7). In dem Plasmid pWP14a liegt neben dem IS140 Element ein aacC3 Gen,

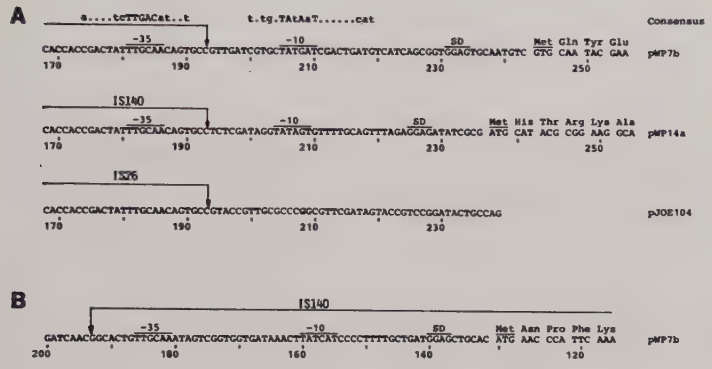

Abbildung 6:

DNS-Sequenzen der Plasmide pWP7b, pWP14a und pJOE104 proximal des rechten Endes von IS140 (vgl. Abb. 7). (A) Nicht-kodierende Stränge der Plasmide pWP7b und pWP14a sind in 5'/3' Richtung angegeben. Das rechte Ende von IS140 ist jeweils durch Pfeile angedeutet und ist durch das Ende der Sequenzidentität der drei Plasmide ausgehend von der in IS140 enthaltenen PstI Schnittstelle (Basenpaar Nr. 35) bis zum Basenpaar Nr. 193 festgelegt entsprechend in Abb. 11 verwendeten Numerierung. Mögliche Promotorstrukturen und Translationsinitiationssignale sind durch horizontale Linien markiert, ebenso wie die Startcodons der aacC4 bzw. aacC3 Gene der Plasmide pWP7b bzw. pWP14a und des offenen Leserahmens innerhalb von IS140 (9). Die Consensus Sequenz für die konservierten Hexanukleotide (- 35 und - 10) für E. coli Promotoren (57) wurde ebenfalls angegeben; SD = Shine-Dalgarno Sequenz (58); Met = Methionin;

(B) Komplementärer Strang der in (A) dargestellten Sequenz von pWP7b in umgekehrter Orientierung.

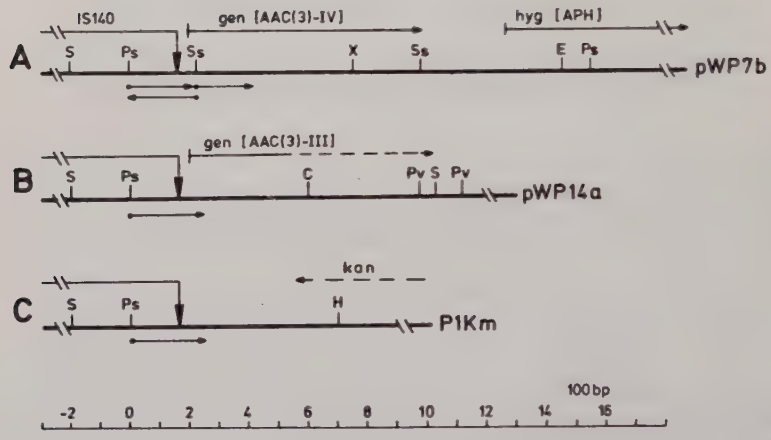

Abbildung 7:

DNS-Sequenzierungsstrategie für die Festlegung des rechten Endes von IS140.
Fragmente der Plasmide pWP7b(A), pWP14a(B) und pJOE104(C) wurden in der durch horizontale Pfeile unter der Restriktionskarte angegebenen Richtung sequenziert. Das rechte Ende von IS140 ist durch Pfeile angezeigt, ebenso wie die Transkriptionsrichtung der AAC(3)-IV (AAC(3)-III), APH und Kanamycin-Resistenz (59) kodierenden Gene (gen, hyg, kan). Nur eine Kopie der das Kanamycin-Resistenzgen von pJOE104 (Tn2680) in direkter Orientierung flankierenden IS140 (IS26) Elemente ist eingezeichnet (59);
weitere Symbole: s. Abb. 2

in dem Plasmid pWP7b ein aacC4 Gen. Das Plasmid pJOE104 enthält eine Kanamycin-Resistenzdeterminante, welche von direkten Repetitionen von IS140 umgeben ist und als Transposon Tn2680 bezeichnet wurde (59).

DNS-Sequenzierung erfolgte jeweils von der PstI Schnittstelle innerhalb von IS140 in Richtung rechtes Ende des Elementes (s. Abb. 7). Wie in Abbildung 6A dargestellt, ergab sich jeweils Sequenzidentität bis zum Basenpaar Nr. 193 entsprechend der in Abb. 11 verwendeten Numerierung. Das rechte Ende von IS140 wurde durch das 3'Ende der Sequenz $^{5'}$TTTGCAACAGTGCC$^{3'}$ festgelegt. Dieses Ergebnis wurde von Mollet et.al. (9) durch die Bestimmung der gesamten DNS-Sequenz des mit IS140 identischen Elementes IS26 bestätigt. IS26 wies an den Enden 14 bp invertierte Repetitionen auf und führte zu 8 bp direkten Repetitionen an der Insertionsstelle. Außerdem wurde ein offener Leserahmen nachgewiesen, welcher für eine mögliche Transposase mit 234 Aminosäuren kodierte (9). Die Ablesung dieses Genproduktes erfolgte von einem am rechten Ende von IS140 lokalisierten Promotor aus, dessen palindrome -35 Region innerhalb der 14 bp invertierten Repetitionen des Elementes lag (s. Abb. 6B). Der Abstand zu der in IS140 gelegenen -10 Region betrug 20 bp und stimmte mit der Consensus Sequenz zwar nicht überein, wurde jedoch für andere Promotoren ebenfalls beschrieben (57).

Aus der Bestimmung des rechten Endes von IS140 ergab sich, daß die palindrome -35 Sequenz des Elementes gleichzeitig Bestandteil des Promotors für das benachbarte aacC3 Gen des Plasmids pWP14a war

(s. Abb. 6A). Während die -35 Region Teil des rechten Endes von IS140 war, lag die -10 Region des Promotors für das aacC3 Gen bereits außerhalb des Elementes. Eine analoge Struktur wurde für das aacC4 Gen des Plasmids pWP7b nachgewiesen (s. Abb. 6A).

Die Ablesung des Kanamycin-Resistenzgens des Transposons Tn2680 erfolgte dagegen vom linken Ende einer Kopie von IS140 aus in Richtung rechtes Ende der zweiten Kopie von IS140 (s. Abb. 7, 59). Die in dieser Arbeit bestimmte DNS-Sequenz proximal des rechten Endes von IS140 in dem Transposon Tn2680 des Plasmids pJOE104 enthielt keine für E. coli typische Promotorstruktur (s. Abb. 6A). Dieses Ergebnis stimmte mit der von Iida et.al. (59) nachgewiesenen Transkriptionsrichtung für das Kanamycin-Resistenzgen des Transposons Tn2680 überein.

II. Analyse von aacC4 Genen

1. Physikalische Kartierung AAC(3)-IV kodierender Plasmide und Lokalisierung von Antibiotika-Resistenzgenen und IS140

Aus Apramycin-resistenten Salmonella Stämmen von zwei verschiedenen infektiösen Ausbrüchen in Pferden wurden die zwei identischen Plasmide pWP7b und pWP41b isoliert, sowie zwei strukturell verwandte R-Plasmide, pWP7a und pWP41a (s. Tab. 3 und Abb. 8). Diese Plasmide verliehen ihrer Wirtszelle Resistenz gegen Apramycin und Hygromycin B. Ein ähnliches Plasmid, pJR225, welches zusätzlich für Tetracyclin-Resistenz kodierte (16), wurde in verschiedenen Enterobacteriaceen nachgewiesen.

Apramycin wurde in den USA in Feldversuchen eingesetzt, in denen Schweine und Rinder mehrere Tage mit hohen Dosen des Antibiotikums behandelt wurden (16). Heute wird Apramycin therapeutisch kaum noch verwendet. Hygromycin B, das die Proteinbiosynthese von Prokaryonten und Eukaryonten hemmt, wird in der Veterinärmedizin vor allem gegen Spulwürmer eingesetzt.

Apramycin-Resistenz beruht auf dem Vorhandensein der Acetyltransferase AAC(3)-IV. Das von Rao et.al. (17) nachgewiesene APH(4) Enzym aus pJR225 bewirkt Resistenz gegen Hygromycin B. Die in dieser Arbeit untersuchten Plasmide kodierten ebenfalls für eine Hygromycin B-Phosphoryltransferase (W. Piepersberg, persönl. Mitteilung).

Die in Abbildung 2 und 8 dargestellten Restriktionskarten der Plasmide pWP7b, pWP7a und pWP41a (25) wurden durch Bestimmung der Erkennungsstellen für die Restriktionsendonukleasen SstI und BstEII in Plasmid pWP7b ergänzt.

Die Gene für Apramycin- und Hygromycin B-Resistenz lagen auf einem bezüglich des Restriktionsmusters homologen 3,5 kb SalI Fragment. Dem aacC4 Gen war jeweils eine Kopie des transponierbaren Elementes IS140 benachbart. Die Plasmide pWP7a und pWP41a enthielten das gesamte pWP7b Genom, das im Fall von pWP7a von invertierten, im Fall von pWP41a von direkten Repetitionen von IS140 umgeben war. In dem R-Plasmid pWP41a lag daneben eine dritte Kopie von IS140 vor sowie eine zweite Kopie der Apramycin-, Hygromycin B-Resistenzdeterminante in invertierter Orientierung.

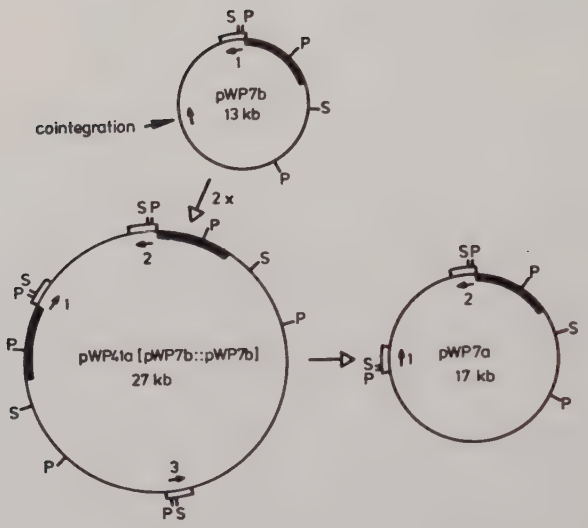

Abbildung 8:

Schematische Darstellung der Plasmide pWP7b, pWP41a und pWP7a und deren hypothetische Verwandtschaftsbeziehungen.

pWP41a könnte durch Kointegratbildung zwischen zwei Molekülen von pWP7b an der durch einen großen Pfeil angedeuteten Stelle mittels IS140 erfolgt sein.
Nicht ausgefüllte Balken = Kopien von IS140 in der durch Pfeile angegebenen Orientierung; ausgefüllte Balken = Apramycin- und Hygromycin B-Resistenzdeterminante;
P = PstI; S = SalI.

Das Plasmid pWP41a könnte folglich durch Fusion zweier pWP7b Moleküle mittels des IS140 Elementes an der in Abbildung 8 durch einen Pfeil angedeuteten Stelle entstanden sein. pWP41a erwies sich in *rec*$^+$ *E. coli* K-12 Stämmen als sehr stabil. Dennoch könnte durch Rekombination von zwei IS140 Elementen in pWP41a ein pWP7a ähnliches Plasmid in der Natur entstanden sein, in welchem eine transposonähnliche Struktur vorlag mit invertierten Repetitionen von IS140. Transposition wurde nicht untersucht, da die innerhalb beider IS140 Elemente von pWP7a lokalisierten Gene unbekannt waren.

Für weitere Analysen wurde das kleinste dieser Gruppe von Plasmiden, pWP7b, verwendet.

2. Expression der Apramycin- und Hygromycin B-Resistenzgene des Plasmids pWP7b in Minizellen, und Hinweise auf das Vorliegen einer polycistronischen Struktur

Die Plasmide pWP701 und pWP703 (s. Tab. 4 und Abb. 2) wurden in DS410 transformiert, und die in isolierten Minizellen gebildeten Produkte analysiert. In beiden Fällen wurden zwei Proteine mit apparenten Molekulargewichten von 27,5 kd und 29,5 kd nachgewiesen, welche mit gereinigtem AAC(3)-IV Enzym komigrierten (s. IV.2.2). Von dem zusätzlich für Hygromycin B-Resistenz kodierenden Plasmid pWP703 wurde daneben ein Protein von 41 kd gebildet, das wahrscheinlich dem APH(4) Enzym entsprach (17, 60; s. Abb. 9).

Für die Bestimmung der Transkriptions- und Translationsrichtung des *aac*C4 Gens wurden die Plasmide pWP703-1 und pWP703-2, welche jeweils einen Teil des *aac*C4 Gens des Plasmids pWP7b enthielten, in Minizellen exprimiert

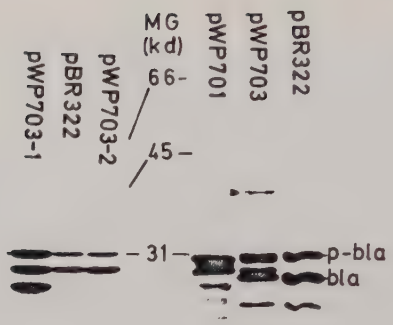

Abbildung 9:

Expression von aacC4 kodierenden Plasmiden in Minizellen. Die Herkunft und Konstruktion von Derivaten des R-Plasmids pWP7b ist oben beschrieben (s. Tab. 4 und Abb. 2; s. Legende zu Abb. 5)

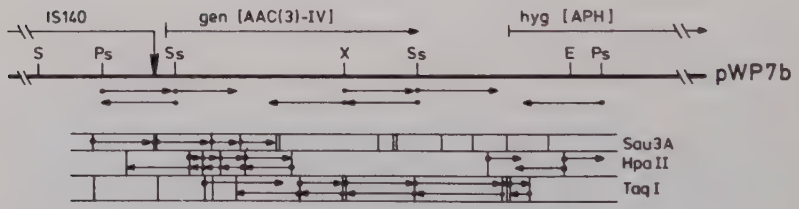

Abbildung 10:

Strategie für die DNS-Sequenzierung des aacC4 Gens des Plasmids pWP7b.
In M13-Vektoren klonierte Fragmente wurden in der durch Pfeile angegebenen Richtung sequenziert (s. Legende zu Abb. 7).

(s. Tab. 4 und Abb. 2). Wie in Abbildung 9 gezeigt, wurde von pWP703-1 ein Protein von 23,5 kd gebildet, während von pWP703-2 kein Produkt nachgewiesen werden konnte, das nicht von pBR322 kodiert wurde. Das N-terminale Ende des AAC(3)-IV Enzyms war folglich in dem in pWP703-1 enthaltenen 1,0 kb SalI/XhoI Fragment kodiert. Ablesung des aacC4 Gens erfolgte proximal von IS140 in Richtung der einzigen XhoI Erkennungsstelle der aacC4 kodierenden Region.

Obwohl das gesamte Strukturgen für das Hygromycin B-Resistenzgen auf dem 2,5 kb XhoI/SalI Fragment des Plasmids pWP703-2 enthalten war (18, 60), wurde dieses in Minizellen nicht exprimiert. Dieser Befund führte zu der Hypothese, daß das aphH2 Gen (unsere Benennung) von demselben Promotor abgelesen wird wie das aacC4 Gen. Dies sollte durch DNS-Sequenzierung der intercistronischen Region des Plasmids pWP703 bestätigt werden.

3. DNS-Sequenzierung des aacC4 Gens

Für die DNS-Sequenzierung des 1,65 kb PstI Fragmentes des Plasmids pWP701 nach Sanger (37) wurden die in Abbildung 10 dargestellten Fragmente in M13 Vektoren kloniert und in der durch Pfeile angegebenen Richtung sequenziert. Bei dieser Methode traten an GC-reichen Sequenzen infolge von DNS-Sekundärstrukturen sog. Kompressionen auf. Aufgrund der Ergebnisse der Aminosäuresequenzierung (s. IV. 4) wurde die DNS-Sequenz von den Erkennungsstellen für BstEII und XhoI ausgehend in beiden Richtungen nach der Methode von Maxam und Gilbert (35) überprüft und an zwei Stellen (Position 365 und Position 832) gegenüber der zunächst postulierten

```
                                                            60
GATCGACATTCACTCCGCGTTCAGCCAGCATCTCCTGCAGCTCACGGTAACTGATGCCGT
                                                           120
ATTTGCAGTACCAGCGTACGGCCCACAGAATGATGTCACGCTGAAAATGCCGGCCTTTGA
                                                           180
ATGGGTTCATGTGCAGCTCCATCAGCAAAAGGGGATGATAAGTTTATCACCACCGACTAT
                                                           240
TTGCAACAGTGCCGTTGATCGTGCTATGATCGACTGATGTCATCAGCGGTGGAGTGCAAT
                                                           300
GTCGTGCAATACGAATGGCGAAAAGCCGAGCTCATCGGTCAGCTTCTCAACCTTGGGGTT
                                                           360
ACCCCCGGCGGTGTGCTGCTGGTCCACAGCTCCTTCCGTAGCGTCCGGCCCCTCGAAGAT
                                                           420
GGGCCACTTGGACTGATCGAGGCCCTGCGTGCTGCGCTGGGTCCGGGAGGGACGCTCGTC
                                                           480
ATGCCCTCGTGGTCAGGTCTGGACGACGAGCCGTTCGATCCTGCCACGTCGCCCGTTACA
                                                           540
CCGGACCTTGGAGTTGTCTCTGACACATTCTGGCGCCTGCCAAATGTAAAGCGCAGCGCC
                                                           600
CATCCATTTGCCTTTGCGGCAGCGGGGCCACAGGCAGAGCAGATCATCTCTGATCCATTG
                                                           660
CCCCTGCCACCTCACTCGCCTGCAAGCCCGGTCGCCCGTGTCCATGAACTCGATGGGCAG
                                                           720
GTACTTCTCCTCGGCGTGGGACACGATGCCAACACGACGCTGCATCTTGCCGAGTTGATG
                                                           780
GCAAAGGTTCCCTATGGGGTGCCGAGACACTGCACCATTCTTCAGGATGGCAAGTTGGTA
                                                           840
CGCGTCGATTATCTCGAGAATGACCACTGCTGTGAGCGCTTTGCCTTGGCGGACAGGTGG
                                                           900
CTCAAGGAGAAGAGCCTTCAGAAGGAAGGTCCAGTCGGTCATGCCTTTGCTCGGTTGATC
                                                           960
CGCTCCCGCGACATTGTGGCGACAGCCCTGGGTCAACTGGGCCGAGATCCGTTGATCTTC
                                                          1020
CTGCATCCGCCAGAGGGCGGGATGCGAAGAATGCGATGCCGCTCGCCAGTCGATTGGCTG
                                                          1080
AGCTCATGAGCGGAGAACGAGATGACGTTGGAGGGGCAAGGTCGCGCTGATTGCTGGGGC
                                                          1140
AACACGTGGAGCGGATCGGGGATTGTCTTTCTTCAGCTCGCTGATGATATGCTGACGCTC
                                                          1200
AATGCCGTTTGGCCTCCGACTAACGAAAATCCCGCATTTGGACGGCTGATCCGATTGGCA
                                                          1260
CGGCGGACGGCGAATGGCGGAGCAGACGCTCGTCCGGGGGCAATGAGATATGAAAAAGCC
                                                          1320
TGAACTCACCGCGACGTCTGTCGAGAAGTTTCTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGA
                                                    1368
CCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGAATCTCGTGCTTTCAGCTTCGA
```

Abbildung 11:

DNS-Sequenz der aacC4 kodierenden Region des Plasmids pWP7b. Gezeigt ist der nicht-kodierende Strang von 5' in 3'Richtung beginnend an der in Abb. 10 eingezeichneten ersten Sau3A Schnittstelle bis zu der letzten TaqI Erkennungsstelle. Start- und Stopcodons für das aacC4 Gen (Pos. 244 und 1027) sowie das Startcodon für das daran anschließende aphH2 Gen (Pos. 1250; 18, 60) sind unterstrichen.

Tabelle 6: Codon-Verwendung bei der Proteinbiosynthese der pWP7b kodierten Enzyme AAC(3)-IV und APH(4)

Aminosäure[a]	Mögliche Codons	Verwendung für Synthese von AAC(3)-IV	APH(4)	Aminosäure[a]	Mögliche Codons	Verwendung für Synthese von AAC(3)-IV	APH(4)
Phe	UUU	4	2	Ala	GCU	2	7
	UUC	4	14		GCC	11	10
					GCA	4	6
					GCG	5	14
Leu	UUA	0	0				
	UUG	6	3				
	CUU	8	5	Tyr	UAU	2	7
	CUC	9	9		UAC	1	4
	CUA	0	0				
	CUG	13	9	His	CAU	5	2
					CAC	5	4
Ile	AUU	2	5				
	AUC	6	7	Gln	CAA	2	7
	AUA	0	2		CAG	6	9
Met	AUG	4	8	Asn	AAU	2	4
	(GUG)[b]	(1)[b]	(0)[b]		AAC	2	3
Val	GUU	4	3	Lys	AAA	1	2
	GUC	9	14		AAG	6	4
	GUA	3	4				
	GUG	4	4	Asp	GAU	9	14
					GAC	7	12
Ser	UCU	2	2				
	UCC	2	6	Glu	GAA	4	11
	UCA	2	0		GAG	9	11
	UCG	4	3				
	AGU	0	2	Cys	UGU	1	2
	AGC	6	11		UGC	3	5
Pro	CCU	3	2	Arg	CGU	3	7
	CCC	6	4		CGC	7	6
	CCA	9	1		CGA	4	3
	CCG	7	8		CGG	2	6
					AGA	2	1
					AGG	1	3
Thr	ACU	0	4				
	ACC	2	5				
	ACA	3	3	Gly	GGU	7	5
	ACG	4	5		GGC	5	6
					GGA	4	7
					GGG	7	6
Trp	UGG	5	8				

[a] Aminosäuren wurden entsprechend der von der IUPAC-IUB Kommission vorgeschlagenen Nomenklatur abgekürzt

[b] d.h. als "Startcodon" verwendetes GUG

Tabelle 7: Position von Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen in dem in Abbildung 11 dargestellten 1368 bp Fragment des Plasmids pWP7b

Restriktionsenzym[a]	Erkennungssequenz[b]	Position[c]
AatII	GACGT/C	1273
AcyI	GPu/CGPyC	512, 1273
AluI	AG/CT	39,135,269,281,328,1021,1115,1329,1361
AvaI	C/PyCGPuG	793
AvaII	G/G$^{A}_{T}$CC	321, 400, 483, 868
BanI	G/GPyPuCC	512, 738
BanII	GPuGCPy/C	268, 1020
BbvI	GC$^{A}_{T}$GCN$_8$/	37, 133, 315, 391, 533, 559, 699, 1327
BglI	GCCN$_n$/NGGC	550
BstEII	G/GTNACC	297
DdeI	C/TNAG	1018
EcoRII	/CC$^{A}_{T}$GG	927
FnuDII	CG/CG	16, 781, 907, 1063, 1270
Fnu4HI	GC/NGC	556, 998
FokI	GGATG(CATCC)N$_9$/	153, 541, 765, 964, 980
HaeII	PuGCGC/Py	512, 535, 815
HaeIII	GG/CC	80, 112, 347, 362, 381, 566, 940, 1151
HgaI	GACGC(GCGTC)N$_5$/	341, 782, 1311
HgiAI	G$^{A}_{T}$GC$^{A}_{T}$/C	268, 1020
HhaI	GCG/C	394, 513, 531, 536, 816, 1064
HincII	GTPy/PuAC	932
HinfI	G/ANTC	1346
HpaII	C/CGG	110, 305, 345, 403, 481, 628, 1234
HphI	GGTGA(TCACC)N$_8$/	167, 1266
MboII	GAAGA(TCTTC)N$_8$/	355, 759, 849, 956, 986, 1110
MluI	A/CGCGT	780
MnlI	CCTC(GAGG)N$_7$/	351,379,407,425,610,669,973,1051,1153,1337
NaeI	GCC/GGC	109
NciI	CC/$^{C}_{G}$GG	304, 403, 627, 1234
PstI	CTGCA/G	35
RsaI	GT/AC	68, 76, 661, 778
Sau3AI	/GATC	1,197,208,375,457,582,592,897,946,954,1094, 1188,1294
Sau96I	G/GNCC	80,321,347,361,381,400,483,565,868,939
ScrFI	CC/NGG	304, 403, 627, 927, 1234
SfaNI	GCATC(GATGC)N$_8$/	28, 53, 685, 702, 963, 981, 995, 1324
SstI	GAGCT/C	268, 1020
TaqI	T/CGA	3, 210, 353, 377, 455, 650, 785, 794, 1010, 1281, 1296, 1305, 1365
Tth111I	GACN/NNGTC	1307
XhoI	C/TCGAG	793
XhoII	Pu/GATCPy	945

[a] Erkennungssequenzen für folgende Enzyme waren nicht vorhanden: AccI, AhaIII, ApaI, AsuII, AvaIII, AvrII, BalI, BamHI, BclI, BglII, BssHII, ClaI, EcoRI, EcoRV, HindIII, HpaI, KpnI, MaeI, MstI, MstII, NcoI, NdeI, NruI, PvuI, PvuII, SaeII, SalI, ScaI, SmaI, SphI, SstII, StuI, XbaI, XmaIII.

[b] von 5' in 3' Richtung; Schrägstrich = Schnittstelle; N = G, A, T oder C; Pu = G oder A, Py = C oder T

[c] Positionsnummern entsprechen dem ersten Basenpaar am 5'Ende der Erkennungssequenz (s. Abb. 11) und wurden mit dem von M. Jarsch erweiterten Programm von J. Messing ermittelt.

Sequenz (25) korrigiert. Daraus ergab sich der in Abbildung 11 gezeigte offene Leserahmen von 783 bp, der sich von GTG (Pos. 244) bis TAG (Pos. 1027) erstreckte und für ein Protein vom Molekulargewicht 28,5 kd (261 Aminosäuren) kodierte. In Tabelle 6 wurden die für jeweils eine Aminosäure verwendeten Codons der aacC4 und aphH2 Strukturgene verglichen. Für die in Abbildung 11 dargestellte Sequenz der aacC4 kodierenden Region des Plasmids pWP7b wurden Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen mit Hilfe des von J. Messing erhaltenen Computerprogrammes Version 2.1. ermittelt (s. Tab. 7; 42).

Dem Strukturgen für das AAC(3)-IV Enzym war eine für E. coli typische Promotorregion vorangeschaltet (57), deren -35 Region innerhalb des rechten Endes von IS140 lokalisiert war (s. I.3 und Abb. 6A). Der Abstand zwischen dieser -35 Region und der -10 Sequenz betrug in diesem Fall 18 bp. Eine mögliche Ribosomenerkennungsstelle der Sequenz $^{5'}$GGAG$^{3'}$ lag 9 bp von dem als "Startcodon" nachgewiesenen GTG (Pos. 244) entfernt (s. IV. 4). In der Region zwischen dem "Stopcodon" TAG (Pos. 1027) des aacC4 Gens und dem "Startcodon" ATG (Pos. 1250) des benachbarten aphH2 Gens (18, 60) lagen keine für E. coli charakteristischen Sequenzen für die Transkriptionsinitiation vor. Die Sequenz $^{5'}$GGGGG$^{3'}$ im Abstand von 9 bp von ATG (Pos. 1250) könnte die Bindung des gebildeten Transkriptes an Ribosomen bewirken.

Diese Ergebnisse bestätigten die Hypothese, daß die Apramycin- und Hygromycin B-Resistenzgene des Plasmids pWP7b von einem gemeinsamen Promotor ausgehend

transkribiert wurden, der teilweise innerhalb des benachbarten IS140 Elementes lokalisiert war (s. Abb. 12). Dagegen waren am 5' Ende der aacC4 und aphH2 Gene in geeignetem Abstand zu den jeweiligen Startcodons Translationsinitiationssignale vorhanden (58, 60).

Inzwischen wurde von Kaster und Mitarbeitern (60) von dem mit pWP7b verwandten Plasmid pJR225 ein langes Transkript isoliert, welches mit aacC4 und aphH2 Strukturgenen hybridisierte. Apramycin- und Hygromycin B-Resistenz kodierende Gene lagen offenbar in allen bisher untersuchten Plasmiden in einer operonähnlichen Struktur vor, deren Transkription von einem teilweise in IS140 lokalisierten Promotor initiiert wurde (s. Abb. 8 und 12; 60).

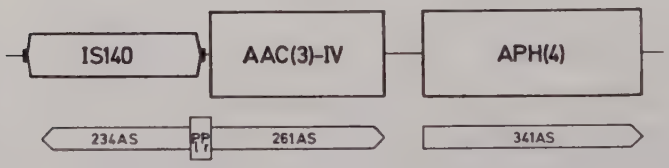

Abbildung 12:

Schematische Darstellung der Apramycin- und Hygromycin B-Resistenz kodierenden polycistronischen Struktur. Transkriptionsrichtung und Lokalisation der Promotoren (P_L, P_R) für die aacC4 und aphH2 Gene sowie für den in IS140 enthaltenen offenen Leserahmen (OLR) sind eingezeichnet.

III. Vergleich der DNS-Sequenzen der aacC3 und aacC4 Gene und der daraus ermittelten Aminosäuresequenzen

Die für das aacC4 Gen ermittelte DNS-Sequenz wurde mit der von R. Allmansberger (56) bestimmten Sequenz des aacC3 Gens aus pWP14a verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 13 dargestellt. Für die beiden Gene ergab sich 38,6 % Homologie der DNS-Sequenzen, das entspricht 317/821 identischen Basenpaaren. Ein Vergleich der aus diesen Sequenzen ermittelten Aminosäuresequenzen ergab 33,2 % Homologie, das entsprach 91 /274 identischen Aminosäureresten (s. Abb. 14). Homologiewerte für DNS- und Aminosäuresequenzen wurden folgendermaßen definiert:

$$\% \text{ Homologie} = \frac{\text{Zahl übereinstimmender Reste} \cdot 100}{\text{Gesamtzahl aller Reste}} ,$$

wobei sich die Gesamtzahl aller Reste aus der Summe übereinstimmender und nicht übereinstimmender Reste und der Hälfte der notwendigen Lücken ergab.

Für die aus den DNS-Sequenzen der aacC3 und aacC4 Gene ermittelten Aminosäuresequenzen wurden wahrscheinliche Sekundärstrukturen nach zwei verschiedenen Methoden (44, 45) ermittelt. In Abbildung 14 sind die mindestens nach einer Methode übereinstimmenden Sekundärstrukturen der AAC(3)-III und AAC(3)-IV Enzyme gezeigt. Für die übrigen Aminosäuresequenzbereiche konnte entweder keine Sekundärstruktur ermittelt werden, d.h. weder wahrscheinliche ß-Faltblatt- oder α -Helix-Strukturen noch Schleifen (sog. "Turns"), oder die nach mindestens einer Methode ermittelten Sekundärstrukturen stimmten für beide Proteine nicht überein (s. Abb. 14). Homologe Primär- und Sekundärstrukturen der aus DNS-Sequenzen ermittelten Proteinsequenzen für die Enzyme AAC(3)-III und AAC(3)-IV lagen vor allem in den N-terminalen Hälften vor.

```
PWP7B   GTG CAA TAC GAA TGG CGA AAA GCC GAG CTC ATC GGT CAG CTT CTC AAC CTT
PWP14A  A** *** *** C*T AC* **G **G **A ATA ACG GAG *CA ATT *GA AAA *** **C

PWP7B   GGG GTT ACC CCC GGC GGT GTG CTG CTG GTC CAC AGC TCC TTC CGT AGC GTC
PWP14A  **A **C CAA A** **T *AC C** T** A** **G **T GC* **A C*T AAA GCG A*T

PWP7B   CGG CCC CTC GAA GAT GGG CCA CTT GGA CTG ATC GAG GCC CTG CGT GCT GCG
PWP14A  G*T **G G** *** *GA **A G*G GAG ACG G*C G*T *CC **G T*A **C T*C ***

PWP7B   CTG GGT CCG GGA GGG ACG CTC GTC ATG CCC         TCG TGG TCA
PWP14A  G*T **G *** ACT **C **T     **G *** GGA TAC GCG *** *** GAC CGA TCA

PWP7B                                   GGT CTG GAC GAC GAG
PWP14A  CCC TAC GAG GAG ACT CTG AAT GGC GCT C*G T** **T *** A*A GCC CGC CGT

PWP7B               CCG TTC GAT CCT GCC ACG TCG CCC GTT ACA CCG GAC CTT GGA
PWP14A  ACC TGG CCG *** *** *** **C **A *** G*C GGG AC* TAC *GT *GG T*C **C

PWP7B   GTT GTC TCT GAC ACA TTC TGG CGC CTG CCA AAT GTA AAG CGC AGC GCC CAT
PWP14A  C*G C*G AA* C*A TTT C*G GTT *AA GCC **C GGC *CG CG* *** *** **G **C

PWP7B   CCA TTT GCC     TTT GCG GCA GCG GGG CCA CAG GCA GAG CAG ATC ATC TCT
PWP14A  **C GA* **A TCG A*G *TC **G *TT **T **G *TA **T **A AC* C*G *CG GAG

PWP7B   GAT CCA TTG CCC CTG CCA CCT CAC TCG CCT GCA         AGC CCG GTC GCC
PWP14A      **T CAC GAA **C GGT     *** G*C TTG *GG GAA GGG TCG **C *** *AG

PWP7B   CGT GTC CAT GAA CTC GAT GGG CAG GTA CTT CTC CTC GGC GTG GGA CAC GAT
PWP14A  **G T** GTC CGC **T *GC *** A** *CC **G **G T*G **T *C* CCG *TA A*C

PWP7B   GCC AAC ACG ACG CTG CAT CTT GCC GAG TTG ATG GCA AAG GTT CCC TAT GGG
PWP14A  T** GTT **C G*A T** **C TAC *** *** GC* G*T **G G*T A*C *** A*C AAA

PWP7B   GTG CCG AGA CAC TGC ACC ATT CTT CAG GAT GGC AAG TTG GTA CGC GTC GAT
PWP14A  CGA TG* GTG ACG *AT GAG **G *CG AT* CT* **A *GA AAC *GT GAA *** *CC

PWP7B   TAT CTC             GAG AAT GAC CAC TGC                 TGT GAG CGC
PWP14A  *GG AAA ACG GCA TCA **A T*C **T TCA AA* GGC ATT CTC GAT **C

PWP7B   TTT GCC TTG GCG     GAC AGG TGG CTC AAG GAG AAG AGC CTT CAG AAG
PWP14A  *** **T A*C *AA GGA A*G CC* GAT GCG GTC **A *CT *TA GCA A*T GCT TAC

PWP7B                                   GAA GGT CCA GTC GGT CAT GCC TTT GCT CGG
PWP14A  GTG AAG CTC GGT CGC CAT CGA *** *** GTC **G **C TT* **T CAG TGC TAC

PWP7B   TTG ATC CGC TCC CGC GAC ATT GTG GCG ACA GCC CTG GGT CAA CTG GGC CGA
PWP14A  C** T** GA* G*G *AG *** **C *** A** TTC *G* G*C ACC T*T **T *AG AAG

PWP7B   GAT CCG TTG ATC TTC CTG CAT CCG CCA GAG GGC GGG ATG CGA AGA ATG CGA
PWP14A  C*C TTC GGA GC* ACT *C* ATC GT* *** *CA CA* *AA GCC GCC CAG     **C

PWP7B       TGC CGC TCG CCA GTC GAT TGG CTG AGC TCA
PWP14A  TCT *** GAG     **T TC* *G*
```

Abbildung 13:

Vergleich der DNS-Sequenzen der aacC4 und aacC3 (56) Strukturgene der Plasmide pWP7b und pWP14a.
Die Einführung von Lücken an 159 Basenpaaren zur Erreichung der größtmöglichen Übereinstimmung notwendig. Identische Nukleotide sind durch Sterne gekennzeichnet.

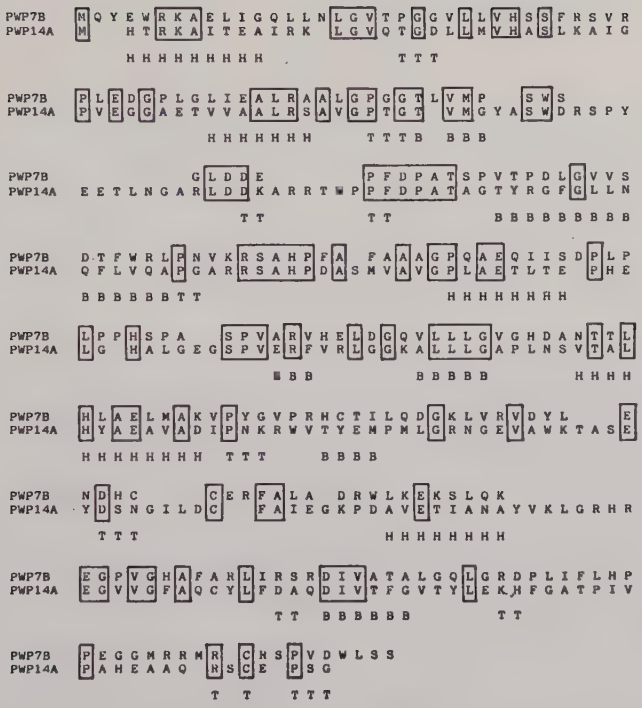

Abbildung 14:

Vergleich der aus den DNS-Sequenzen ermittelten Primär- und Sekundärstrukturen der AAC(3)-IV (pWP7b) und AAC(3)-III (pWP14a) Enzyme.
Die mindestens nach einer Methode übereinstimmenden Sekundärstrukturen sind gezeigt (s. Text). Identische Aminosäuren sind eingerahmt. Die Position der Lücken entspricht Abbildung 13.
Verwendete Symbole: H = α-Helix; B = ß-Faltblatt; T = "Turn" (Schleife)

IV. Anreicherung und Charakterisierung der Aminoglykosid-(3)-N-Acetyltransferase von Typ IV

Aus der in Punkt II.3. beschriebenen DNS-Sequenz ergab sich für das aacC4 Gen ein offener Leserahmen von 783 bp, der für ein Protein mit 261 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 28,5 kd kodiert. Zwei Genprodukte mit vergleichbarem apparentem Molekulargewicht (27,5 kd und 29,5 kd) wurden von dem für Apramycin-Resistenz kodierenden Plasmid pWP701 in Minizellen gebildet (s. II.2).

Reinigung der pWP701 kodierten Aminoglykosid-(3)-N-Acetyltransferase vom Typ IV sollte zeigen, welches Startcodon bei der Translation verwendet wird, und inwieweit posttranslationale Prozessierung erfolgt. Ferner sollten molekulare Eigenschaften des gereinigten AAC(3)-IV Enzyms sowie dessen Affinität zu verschiedenen Substraten bestimmt werden und mit bereits bekannten Eigenschaften anderer AAC(3)-Enzyme (1) verglichen werden.

1. Anreicherung der Aminoglykosid-(3)-N-Acetyltransferase vom Typ IV

Für die Anreicherung des AAC(3)-IV Enzyms wurde ein E. coli C600 Stamm verwendet, welcher das Plasmid pWP701 enthielt. In Abbildung 15 sind die wichtigsten Schritte bei der Reinigung der Acetyltransferase zusammengefaßt. Aus etwa 80 g Zellen wurde ein ribosomenfreier Extrakt gewonnen (siehe Teil B Punkt V.1) und durch Affinitätschromatographie an einer Tobramycin Sepharose Säule aufgetrennt. Der Hauptteil der Proteine des S100 Extraktes wurde an

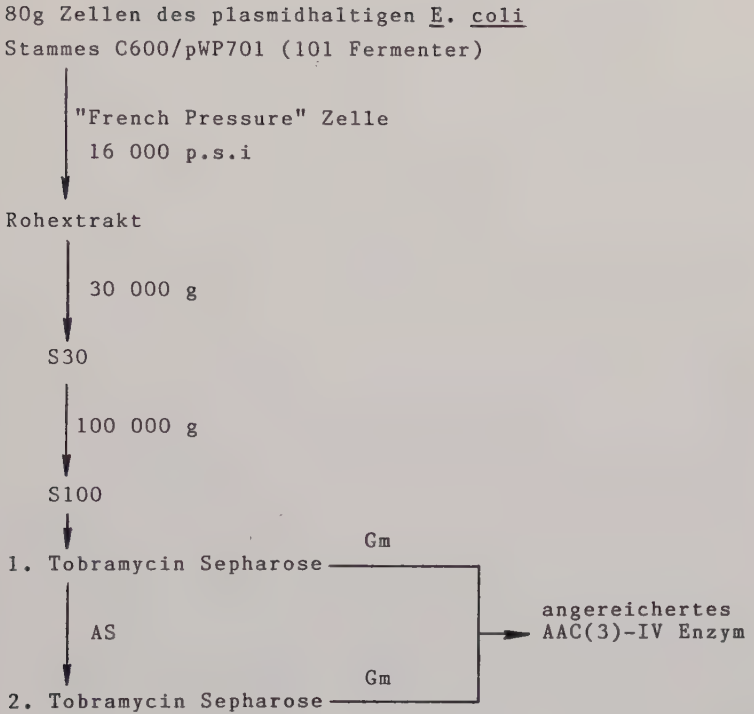

Abbildung 15:

Fließschema der Anreicherung der Aminoglykosid-(3)-N-Acetyltransferase IV aus E. coli C600/pWP701. Verwendete Symbole: AS = Ammoniumsulfatelution; Gm = Gentamicinelution, weitere Symbole: siehe Text

Tobramycin Sepharose nicht gebunden. Durch Waschen mit Ammoniumsulfat wurden über schwache ionische Wechselwirkungen gebundene Fremdproteine und ein Teil des AAC(3)-IV Enzyms eluiert. Nach anschließender Behandlung mit hohen Konzentrationen eines zweiten Substrates, Gentamicin, wurde 63-fach angereicherte Aminoglykosid Acetyltransferase erhalten (siehe Tabelle 8 und Abb. 16). Nach Ammoniumsulfatelution gewonnene Fraktionen enthielten neben angereichertem AAC(3)-IV Enzym eine Vielzahl weiterer Proteine, während sich spezifisch mit Gentamicin eluierte Acetyltransferase bei SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese als weitgehend frei von Fremdproteinen erwies (s. Abb. 16). Ergebnisse einer typischen Anreicherung wurden in Tabelle 8 zusammengefaßt. Das für Affinitätschromatographie relativ uncharakteristische Elutionsverhalten des AAC(3)-IV Enzyms beruhte wahrscheinlich auf der Anionenaustauscherwirkung und der Heterogenität der Tobramycin Sepharose: Infolge der polykationischen Struktur des Tobramycins kann das verwendete Trennmaterial gleichzeitig als Ionenaustauscher wirken. Darüber hinaus ist die Kopplung des Tobramycins an CH-Sepharose an unterschiedlichen Aminogruppen des Aminoglykosids möglich, so daß sich eine stärkere oder schwächere Bindungsaffinität des AAC(3)-IV Enzyms ergeben kann. Um die Ausbeute an gereinigter Acetyltransferase zu erhöhen, wurden die nach Ammoniumsulfatelution erhaltenen Fraktionen vereint und nach Dialyse gegen 10 mM Tris/HCl pH7,6 mit einer weiteren Tobramycin Sepharose Säule in der oben beschriebenen Weise aufgetrennt. Die von beiden Säulen nach Elution mit Gentamicin erhaltenen Fraktionen wurden nach Dialyse für weitere Bestimmungen eingesetzt.

Tabelle 8: Anreicherungsschritte bei der Reinigung des AAC(3)-IV Enzyms aus E. coli C600/pWP701

Anreicherungs-schritt[a]	Gesamt-protein mg	Gesamt-aktivität µkatal	spezifische Aktivität µkatal/mg	Anreicherung	Ausbeute %
S100	2700	87	0,032	1	100
1. Tobramycin Sepharose (Gm)	6,0	12	2,0	63	14
1. Tobramycin Sepharose (AS)	390	39	0,1	3,1	45
2. Tobramycin Sepharose (Gm)	4,0	4,1	1,0	31	4,7

[a] Verwendete Symbole: s. Abb. 15

Abbildung 16:

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von bei der Anreicherung des AAC(3)-IV Enzyms erhaltenen Fraktionen.
(A) S100 von E. coli C600/pWP701
(B) angereichertes AAC(3)-IV Enzym nach Affinitätschromatographie

2. Reinheitskriterien

Der Reinheitsgrad der angereicherten Acetyltransferase wurde durch verschiedene gelelektrophoretische Methoden bestimmt.

2.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Eindimensionale Auftrennung des gereinigten AAC(3)-IV Enzyms durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ergab nach Anfärbung mit Coomassie zwei charakteristische Banden, deren apparente Molekulargewichte zu 27,5 kd und 29,5 kd bestimmt wurden. Bei dieser Trennmethode überwog der Anteil des schneller wandernden Proteins (s. Abb. 16).

2.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese nach O'Farrell (49)

Wurde die gereinigte Acetyltransferase nach der Methode von O'Farrell (49) aufgetrennt, so traten zwei charakteristische Flecken auf mit identischem isoelektrischem Punkt, aber unterschiedlichem Wanderungsverhalten bei SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese in der 2.Dimension. Die Hauptproteinmenge lag hierbei in der langsam wandernden Form vor.

Bei Expression des Plasmids pWP701 in Minizellen traten ebenfalls zwei Genprodukte auf, welche mit gereinigter Acetyltransferase komigrierten, und deren molares Verhältnis je nach Experiment variierte. Die beiden Produkte mit apparenten Molekulargewichten von 27,5 kd und 29,5 kd sind offenbar für das AAC(3)-IV Enzym charakteristisch. Bei beiden angewandten gelelektrophoretischen Methoden erwies sich das AAC(3)-IV Enzym als weitgehend frei von Fremdproteinen.

Für die beiden charakteristischen Produkte des AAC(3)-IV Enzyms nach Auftrennung in SDS-Polyacrylamidgelen waren folgende Erklärungen möglich:

(i) Prozessierung oder Modifikation eines Vorläuferproteins
(ii) Partieller Abbau durch Proteasen
(iii) Partielles Überlesen eines "Stopcodons"
(iv) Translation in zwei verschiedenen Leserahmen
(v) Unterschiedliches Laufverhalten zweier stabiler Konformationen desselben Proteins bei SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

3. Hinweise für das Vorliegen von zwei verschiedenen Konformationen der Acetyltransferase in SDS-Polyacrylamidgelen

Die folgenden Untersuchungen sollten zeigen, daß das gereinigte AAC(3)-IV Enzym in SDS-Polyacrylamidgelen in zwei verschiedenen Konformationen vorlag.

3.1 Partielle Proteolyse mit Staphylococcus aureus V8 Protease

Auftrennung von Peptiden nach partieller Proteolyse mit Staphylococcus aureus V8 Protease durch eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese führt zu einem reproduzierbaren Muster, das für ein Protein charakteristisch ist (50). Handelt es sich bei den beiden für das AAC(3)-IV Enzym typischen Produkten um dasselbe Proteinmolekül, so sollte nach limitierter Proteolyse das identische Peptidmuster auftreten. Um dies nachzuweisen, wurden die nach Auftrennung der gereinigten Acetyltransferase durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese erhaltenen zwei Banden ausgeschnitten und nach

elektrophoretischer Elution mit Staphylococcus aureus V8 Protease partiell verdaut. Die erhaltenen Peptidfragmente wurden durch eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und mit Silbernitrat gefärbt. Die Abbauprodukte beider isolierter Banden erwiesen sich als identisch und stimmten mit dem Peptidmuster der gereinigten Acetyltransferase nach partieller Proteolyse mit Staphylococcus aureus V8 Protease überein. Daraus ließ sich schließen, daß die beiden für das AAC(3)-IV Enzym charakteristischen Produkte sehr ähnlichen oder identischen Proteinmolekülen entsprachen.

3.2 Weitere Hinweise für das Auftreten von zwei verschiedenen Konformationen der Acetyltransferase in SDS-Polyacrylamidgelen

Aus der DNS-Sequenz des aacC4 Gens ergab sich ein einziger längerer offener Leserahmen (s. II. 3), so daß Translation in zwei verschiedenen Rastern auszuschließen war.

Aus der Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz der gereinigten Acetyltransferase (s. IV. 4) ließ sich schließen, daß außer der Abspaltung des Formylrestes an Methionin keine posttranslationale Prozessierung am N-Terminus erfolgte.

Diese Ergebnisse standen im Einklang mit der These, daß die beiden für das AAC(3)-IV Enzym charakteristischen Produkte bei SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zwei verschiedenen Konformationen desselben Proteinmoleküls entsprachen. Modifikation der Acetyltransferase,sowie

die Struktur des C-Terminus beider Formen wurden jedoch nicht untersucht, so daß andere Erklärungmöglichkeiten nicht auszuschließen waren.

4. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz der gereinigten Aminoglykosid-(3)-N-Acetyltransferase vom Typ IV

Durch DNS-Sequenzierung des aacC4 Gens wurde das Vorliegen einer für E. coli typischen Promotorregion und einer potentiellen Ribosomenerkennungsstelle des gebildeten Transkriptes gezeigt (s. II. 3). Nach Regel 4 von Stormo et.al. (61) beträgt bei 77 % aller untersuchten Gene aus E. coli der Abstand zwischen der Shine-Dalgarno Sequenz ($^{5'}$GGAG$^{3'}$) und dem Translationsinitiationscodon vier bis zehn Basenpaare. Folglich könnte die Translation des aacC4-Transkriptes bei AUG (Pos. 239) oder GUG (Pos. 244) beginnen. Welches dieser beiden Startcodons für die Proteinbiosynthese in vivo verwendet wird, sollte durch die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz der gereinigten Acetyltransferase ermittelt werden. Ferner sollte gezeigt werden, ob das gereinigte Protein prozessiert vorlag.

Aminosäuresequenzierung erfolgte nach der Methode von Chang (51). Neben der jeweiligen N-terminalen DABTH-Aminosäure traten bei zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie stets zwei weitere Flecken auf, deren Laufverhalten DABTH-Derivaten von Prolin und Glycin entsprachen. Da diese Produkte bei jedem Abbauschritt auftraten, lag es nahe, daß es sich um methodische Artefakte handelte. Beim ersten Abbauschritt war neben diesen beiden Flecken nur DABTH-Methionin sichtbar, wodurch die Reinheit der verwendeten Acetyl-

transferasepräparation bestätigt wurde. Bei den folgenden Abbauschritten traten wegen unspezifischer Säurespaltung Spuren verschiedener DABTH-Aminosäuren auf, so daß ab dem 6. Abbau keine eindeutige Identifizierung der N-terminalen DABTH-Aminosäure mehr möglich war.

Methionin erwies sich als zugänglich für die Kopplung mit Isothiocyanatverbindungen. Folglich wurde der bei der Initiation der Proteinbiosynthese kovalent an die Aminogruppe des N-terminalen Methionins gebundene Formylrest posttranslational abgespalten. Eine weitere Prozessierung am N-Terminus der Acetyltransferase war nicht erfolgt. Für die N-terminalen sechs Aminosäuren wurde folgende Sequenz ermittelt:

(NH_2)-Met Gln Tyr Glu Trp Arg....-(COOH).

Daraus war zu schließen, daß die Translation des aacC4-Transkriptes mit dem Initiationscodon GUG (Pos. 244) beginnt im Abstand von neun Basenpaaren von der Ribosomenerkennungsstelle. Bisher sind nur vier weitere Fälle bekannt, in denen GUG als Startcodon verwendet wird (61), das entspricht insgesamt 4 % (5/124) aller sequenzierten Gene. Die aus der DNS-Sequenz ermittelte Aminosäuresequenz (s. II.3 und III) stimmte mit den nach der Methode von Chang (51) bestimmten sechs N-terminalen Aminosäureresten überein.

5. Charakterisierung des gereinigten AAC(3)-IV Enzyms

Ein Vergleich aufgrund von DNS-Sequenzierungsergebnissen war nur für die Gene aacC3 und aacC4 möglich. Dagegen waren molekulare Eigenschaften weiterer Aminocyclitol

Acetyltransferasen bereits bekannt (1). Im folgenden sollte daher das gereinigte AAC(3)-IV Enzym näher charakterisiert und mit anderen AAC(3) Enzymen verglichen werden. Die Bestimmung der Affinität der Aminoglykosid-(3)-N-Acetyltransferase IV gegenüber verschiedenen Substraten mit Hilfe der Michaelis-Menten-Kinetik sollte ferner die Auswirkung kinetischer Eigenschaften des modifizierenden Enzyms auf den Resistenzphänotyp in vivo zeigen.

5.1 Bestimmung des Molekulargewichts und der Untereinheitenstruktur

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese des gereinigten AAC(3)-IV Enzyms ergab zwei charakteristische Banden (s. IV. 2), deren apparente Molekulargewichte zu 27,5 kd und 29,5 kd bestimmt wurden. Dies stimmte gut mit dem aus der DNS-Sequenz ermittelten Wert von 28,5 kd überein.

Das Molekulargewicht des nativen AAC(3)-IV Enzyms wurde durch Gelfiltration an einer Sephacryl S300 Säule bestimmt. Wie in Abbildung 17 gezeigt, ergab sich aus dem Elutionsverhalten der Eichproteine für die Aminoglykosid-(3)-N-Acetyltransferase IV ein apparentes Molekulargewicht von 34 kd. Das gereinigte AAC(3)-IV Enzym lag folglich unter den getesteten Bedingungen monomer vor.

5.2 Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Die beiden für das AAC(3)-IV Enzym charakteristischen Flecken auf zweidimensionalen Gelen nach O'Farrell (s. IV. 2, 49) wurden durch Komigration mit gereinigter Acetyltransferase sowie durch Vergleich

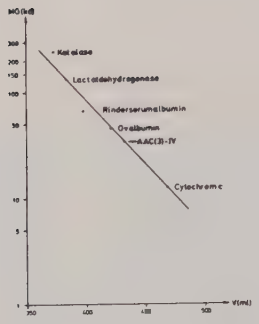

Abbildung 17:

Molekulargewichtsbestimmung des nativen AAC(3)-IV Enzyms durch Gelchromatographie an einer Sephacryl S300 Säule. Halblogarithmische Auftragung des Elutionsvolumens (V) gegen das Molekulargewicht (MG) der Standardproteine und des AAC(3)-IV Enzyms.

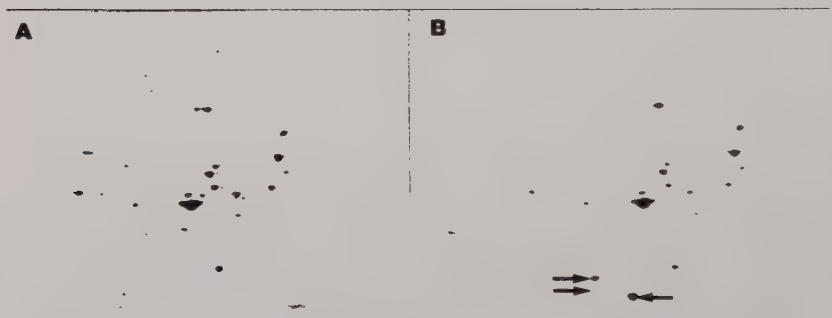

Abbildung 18:

Auftrennung von Zellextrakten nach O'Farrell (49).
(A) E. coli C600
(B) E. coli C600/pWP703
Die durch Pfeile angegebenen Flecken entsprechen den beiden Formen des AAC(3)-IV Enzyms (links) bzw. der pBR322 kodierten ß-Lactamase (rechts).

mit Zellextrakten aus einem plasmidfreien, isogenen (E. coli C600) Stamm identifiziert (s. Abb. 18). Proteine des E. coli K-12 Zellextraktes wurden mit Hilfe des Identifizierungsschemas von Neidhardt et.al. (62) bestimmt. Plasmidkodierte TEM-1 ß-Lactamase wurde durch Vergleich mit plasmidfreien Zellextrakten lokalisiert. Die beiden für das AAC(3)-IV Enzym charakteristischen Flecken wiesen denselben isoelektrischen Punkt auf und lagen links von der pBR322 kodierten ß-Lactamase, deren isoelektrischer Punkt von 5,4 bekannt war (63). Daraus ergab sich für das AAC(3)-IV Enzym ein isoelektrischer Punkt von etwa 5,6. In Tabelle 1 sind die bisher bestimmten molekularen Eigenschaften verschiedener AAC(3) Enzyme zusammengefaßt (s. Teil A).

5.3 Abhängigkeit der Acetyltransferaseaktivität vom pH und von der $MgCl_2$-Konzentration

Bei Verwendung verschiedener Tris/HCl-Puffer mit pH-Werten zwischen 7 und 9 im Standardenzymtest konnte keine signifikante Veränderung der Acetyltransferaseaktivität des gereinigten AAC(3)-IV Enzyms festgestellt werden. In Abwesenheit von Mg^{2+} Ionen im Testgemisch wurde bereits hohe Acetyltransferaseaktivität gemessen. 0,2 mM $MgCl_2$ erwies sich als optimale Konzentration, während bei Konzentrationen zwischen 1 mM und 10 mM $MgCl_2$ zunehmende Abnahme der Acetyltransferaseaktivität auftrat.

5.4 Vergleich der Michaelis-Menten Konstanten (K_M) des gereinigten AAC(3)-IV Enzyms für verschiedene AGA und Korrelation mit entsprechendem Resistenzphänotyp eines Stammes (MHK-Bestimmung)

Die Abhängigkeit der Acetyltransferaseaktivität des gereinigten AAC(3)-IV Enzyms von der Substratkonzentration im Standardenzymtest entsprach bei allen untersuchten AGA einer hyperbolischen Kurve entsprechend Michaelis und Menten. Die Michaelis-Menten Konstanten (K_M) wurden nach Lineweaver und Burk (64) ermittelt (s. Abb. 19) und sind in Tabelle 9 zusammengefaßt. Aus den niedrigen K_M-Werten für Tobramycin und Apramycin verglichen mit anderen untersuchten Aminoglykosiden konnte auf eine relativ hohe Affinität des AAC(3)-IV Enzyms gegenüber diesen Substraten geschlossen werden.

Die erhaltenen K_M-Werte wurden mit den MHK-Werten von E. coli C600 (pWP7b) für die entsprechenden Aminoglykoside verglichen. Ebenso wurden die MHK-Werte für E. coli Stämme mit plasmidkodierten AAC(3)-I, AAC(3)-III und AAC(3)-IV Enzymen für verschiedene AGA verglichen. Als Kontrolle diente ein plasmidfreier, isogener Stamm. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 9 und 10 dargestellt. An der Ausprägung der Resistenz eines Stammes durch plasmidkodierte modifizierende Enzyme sind neben der Bindungsaffinität des Enzyms zum Substrat sowie der Umsatzrate weitere Faktoren beteiligt, wie die Kopienzahl des Plasmids bzw. des Resistenzgens, das Ausmaß der Expression des für das Enzym kodierenden Gens, die Aufnahmerate des Antibiotikums in die Zelle, der Grad der Inaktivierung des

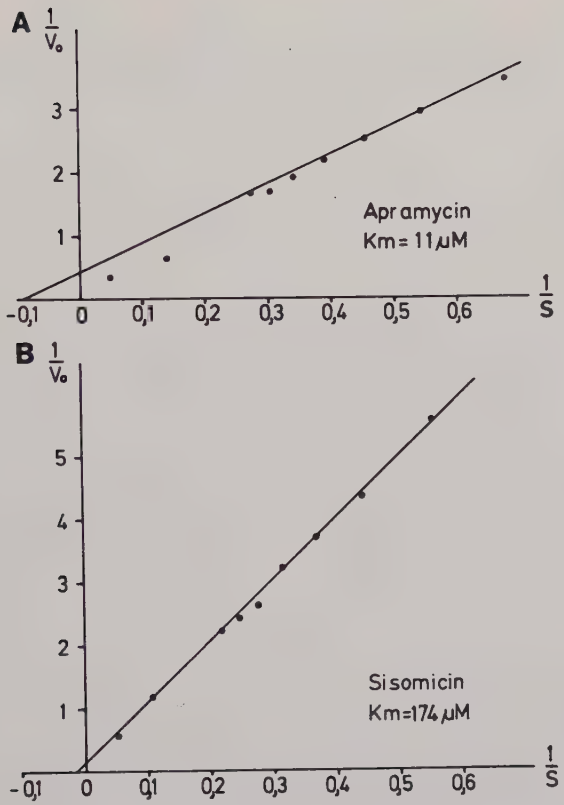

Abbildung 19:

Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten (K_M) des AAC(3)-IV Enzyms nach Lineweaver und Burk (64).
(A) K_M-Bestimmung für Apramycin
(B) K_M-Bestimmung für Sisomicin
Verwendete Symbole: v_o = Acetyltransferaseaktivität ($\frac{\mu katal}{mg}$) im Standardenzymtest; S = AGA-Substratkonzentration (µM)

Antibiotikums nach Modifikation sowie die Bindungsaffinität und die Wirksamkeit des Antibiotikums am Ribosom. Für die untersuchten AGA ergab sich mit Ausnahme des Tobramycins eine gute Übereinstimmung zwischen Substrataffinität (K_M-Wert) des modifizierenden Enzyms mit dem in vivo beobachteten Grad der Resistenz (MHK-Wert), das heißt hohe K_M-Werte korrelierten mit niedrigen MHK-Werten und umgekehrt (s. Tab. 9).

Tabelle 9: Vergleich der Michaelis-Menten Konstanten (K_M) des AAC(3)-IV Enzyms für verschiedene AGA-Substrate mit minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) von E. coli C600/pWP7b für entsprechende Antibiotika

Antibiotikum	Michaelis-Menten Konstante (K_M) von AAC(3)-IV (µM)	Minimale Hemmkonzentration (MHK) von E. coli C600/pWP7b (µg/ml)
Gentamicin C-Komplex	177	50
Gentamicin C1	87	n.b.[a]
Gentamicin C1a	195	n.b.
Gentamicin C2	142	n.b.
Sisomicin	174	50
Kanamycin	241	3
Tobramycin	26	50
Apramycin	11	200

[a] n.b. = nicht bestimmt

Tabelle 10: Vergleich der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) plasmidhaltiger E. coli C600 Stämme für verschiedene AGA

AGA	MHK (µg/ml) für E. coli C600 mit Plasmid pJR88 (AAC(3)-I)[a]	pWP14a (AAC(3)-III)[a]	pWP7b (AAC(3)-IV)[a]	MHK (µg/ml) für E. coli C600 ohne Plasmid
Gentamicin C-Komplex	25	25	50	1,6
Sisomicin	25	25	50	3,1
G418	25	25	12,5	1,6
Netilmicin	1,6	6,2	100	1,6
Tobramycin	1,6	1,6	50	1,6
Kanamycin	1,6	1,6	3,1	1,6
Paromomycin	3,1	3,1	12,5	3,1
Neomycin	6,2	6,2	12,5	6,2
Apramycin	1,6	1,6	200	1,6

[a] plasmidkodierte Aminoglykosid-(3)-N-Acetyltransferasen

D. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde die Struktur, Expression und Verbreitung plasmidkodierter aacC3 und aacC4 Gene untersucht. Hauptziel war die Bestimmung der DNS-Sequenz des aacC4 Gens des Plasmids pWP7b,und Vergleich mit der von R. Allmansberger ermittelten DNS-Sequenz für das aacC3 Gen des Plasmids pWP14a (56). Der Vergleich dieser Gene sollte die von Beneviste und Davies (5) formulierte These überprüfen, nach der die Gene für Aminoglykosid modifizierende Enzyme aus einem gemeinsamen Vorläufergen entstanden sind, welches beispielsweise aus Antibiotika produzierenden Mikroorganismen stammen könnte.

Das neuartige transponierbare Element, IS140, wurde am 5'Ende der aacC3 und aacC4 Gene der Plasmide pWP14a und pWP7b entdeckt (7). Die Beteiligung von IS140 an der Verbreitung und Expression von aacC Genen wurde daher ebenfalls untersucht.

Das aus der DNS-Sequenz für das aacC4 Gen des Plasmids pWP7b ermittelte Genprodukt von 261 Aminosäuren wurde durch proteinchemische Methoden nachgewiesen und näher charakterisiert.

Im folgenden werden die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse diskutiert.

1. Eigenschaften des von pWP7b kodierten AAC(3)-IV-Enzyms im Vergleich zu anderen AAC(3) Enzymen

Das durch Affinitätschromatographie gereinigte AAC(3)-IV Enzym aus E. coli/pWP701 wies ähnlich

wie andere AGA modifizierende Enzyme (1) ein relativ geringes Molekulargewicht von 29 kd auf und lag monomer vor. Aus der DNS-Sequenz ergab sich für das pWP7b kodierte AAC(3)-IV Enzym keine für E. coli charakteristische Signalsequenz am N-Terminus (65). Die Bestimmung der N-terminalen sechs Aminosäuren bestätigte, daß das gereinigte AAC(3)-IV Enzym unprozessiert vorlag.

Von einigen Autoren wurde bisher angenommen, daß AGA-modifizierende Enzyme im periplasmatischen Raum gramnegativer Bakterien lokalisiert sind, da diese durch osmotischen Schock freigesetzt werden können (1, 66). Das in dieser Arbeit charakterisierte, unprozessierte AAC(3)-IV Enzym stimmt jedoch bezüglich seiner Kompartimentierung mit der von Perlin und Lerner (2) für ein APH(3') Enzym gezeigten cytoplasmatischen Lokalisation AGA-modifizierender Enzyme überein. Die folgenden Argumente unterstützen die These, daß AGA-modifizierende Enzyme zumindest bevorzugt im Cytoplasma gramnegativer Bakterien vorliegen:

(i) Im periplasmatischen Raum vorhandene Phosphatasen würden das Substrat, ATP, für APH Enzyme abbauen und phosphoryliertes AGA reaktivieren.

(ii) Für Modifikationsreaktionen notwendige Kosubstrate wie ATP und AcetylCoA liegen nur im Cytoplasma in ausreichenden Konzentrationen vor.

(iii) Modifizierte AGA konnten aus Aminoglykosid enthaltenden Medien, in denen resistente Stämme kultiviert wurden, nicht nachgewiesen werden (1).

(iv) Bisher bekannte, aus DNS-Sequenzen ermittelte, Aminosäuresequenzen für AGA-modifizierende Enzyme (7, 56, 6) wiesen weder eine für E. coli typische Signalsequenz am N-Terminus auf (65) noch für integrale Membranproteine charakteristische hydrophobe Domänen (67).

(v) Für ein APH(3') Enzym wurde gezeigt, daß dieses bei Bildung von Sphäroplasten durch EDTA-Lysozym-Behandlung resistenter E. coli Zellen nicht freigesetzt wird, ebenso wie andere Proteine vergleichbarer Größe, deren charakteristische Lokalisation im Cytoplasma bekannt war (2).

Der Mechanismus der Resistenz durch AGA-modifizierende Enzyme ist noch nicht vollständig geklärt (1, s. Teil A). In dieser Arbeit wurde die Korrelation der Substrataffinität des AAC(3)-IV Enzyms, d.h. des K_M-Wertes mit dem in vivo erzeugten Resistenzphänotyp, dem MHK-Wert, für einige AGA gezeigt.

Die für E. coli C600 Stämme mit plasmidkodierten AAC(3)-I, AAC(3)-III und AAC(3)-IV Enzymen bestimmten MHK-Werte können mit den in Tabelle 1 zusammengefaßten Substratspektren dieser Enzymklassen verglichen werden. Obwohl das pWP14a kodierte AAC(3)-III Enzym in vitro u.a. Kanamycin acetylierte,erwies sich E. coli C600/ pWP14a als Kanamycin sensitiv. An der Ausprägung der Resistenz in vivo sind außer dem Vorhandensein eines modifizierenden Enzyms folglich weitere Faktoren beteiligt (s. Teil C, Punkt IV).

Wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist, beruht die Einteilung der AAC(3) Enzyme in die Klassen I und II auf den unterschiedlichen isoelektrischen Punkten dieser Proteine (1). Inzwischen wurde von Angelatou et.al. (68) ein weiteres plasmidkodiertes AAC(3)-I Enzym charakterisiert, welches im Vergleich zu dem von Williams und Northrop gereinigten Enzym (69) eine andere Aminosäurezusammensetzung aufwies. Die von den Plasmiden pWP14a und pWP113a kodierten AAC(3)-III Enzyme waren nah verwandt (56), enthielten jedoch 14 unterschiedliche von insgesamt 286 Aminosäureresten, was ebenfalls Unterschiede in den isoelektrischen Punkten zur Folge haben könnte. Für Ampicillin-Resistenzgene wurde darüber hinaus nachgewiesen, daß durch Mutationen Veränderungen im Substratspektrum kodierter ß-Lactamasen erzeugt wurden (70). Die Einteilung der AAC(3) Enzyme in sechs Klassen aufgrund des Substratspektrums und molekularer Eigenschaften entspricht daher keineswegs Verwandtschaftsverhältnissen, sondern dient lediglich der Identifizierung AGA-modifizierender Enzyme.

2. Struktur, Expression und Verbreitung von aacC3 Genen

Am Beispiel der aacC3 Gene aus verschiedenen, in der Klinik isolierten, gramnegativen Bakterien konnten Veränderungen der Strukturgene, der Promotorsequenzen und der umgebenden Plasmid-DNS gezeigt werden.

Die aacC3 Gene der Plasmide pWP14a, pWP116a und pWP113a erwiesen sich bezüglich ihrer Restriktionsmuster als sehr ähnlich. Aus DNS-Sequenzierungsergebnissen von R. Allmansberger (56) ging hervor, daß die aacC3 Gene von pWP14a und pWP116a identisch waren und 96,4 % Homologie zu dem aacC3 Gen des Plasmids pWP113a

aufwiesen, wobei 17/31, d.h. 55 % aller Basenpaaraustausche an der sog. "wobble" Position erfolgt waren und bis auf zwei Ausnahmen keine Änderung der Aminosäuresequenz zur Folge hatten. Insertionen bzw. Deletionen kamen in den untersuchten aacC3 Genen nicht vor. Die aus DNS-Sequenzen ermittelten Aminosäuresequenzen der von PWP14a bzw. pWP116a und pWP113a kodierten AAC(3)-III Enzyme enthielten 95,4 % identische Reste (56). Die untersuchten aacC3 Gene sind daher ein Beispiel für in neuerer Zeit, möglicherweise unter dem Selektionsdruck von in der Klinik verwendeten Antibiotika fortschreitende Evolution von Genen. Bestimmung der kinetischen Eigenschaften und des Substratspektrums der verschiedenen AAC(3)-III Enzyme würde daher eventuelle adaptive Veränderungen der Proteine herausstellen können.

Die Transkriptionsinitiation des aacC3 Gens des Plasmids pWP14a erfolgte von einem Promotor aus, dessen - 35 Region innerhalb des rechten Endes des assoziierten IS140 Elementes lokalisiert war. In dem Plasmid pWP116a lag ein teilweise deletiertes IS140 Element in umgekehrter Orientierung von (56), dessen linkes Ende ebenfalls die - 35 Region des Promotors für das benachbarte aacC3 Gen enthielt. Die an den Enden von IS140 vorhandene palindrome - 35 Region mit der Sequenz $\overset{5'}{\underset{TTGCAA}{-35}}\overset{3'}{}$ stimmte mit der Consensus Sequenz für RNS-Polymerase Erkennungsstellen in E. coli gut überein (57). Da diese - 35 Region innerhalb der 14 bp langen, perfekten "inverted repeats" an den Enden von IS140 lag, könnten - unabhängig von der Orientierung des Elementes - in einem geeigneten Abstand vom 3' Ende der Insertionsstelle

vorhandene - 10 Regionen zu einem funktionstüchtigen Promotor ergänzt werden. Im Fall der aacC3 Gene der Plasmide pWP14a und pWP116a betrug der Abstand zwischen - 35 und - 10 Sequenzen der Promotoren für die aacC3 Gene jeweils 17 bp, ein Abstand, der aufgrund von Vergleichen (57) und Mutationsereignissen (71) als optimal anzusehen ist.

Infolge der palindromen Eigenschaft der an den Enden von IS140 lokalisierten - 35 Region, konnte dieser Teil von nach außen und nach innen gerichteten Promotorstrukturen sein. Die Ablesung des in IS140 enthaltenen offenen Leserahmens für eine mögliche Transposase von 234 Aminosäuren erfolgte von einem am rechten Ende des Elementes lokalisierten Promotor aus, dessen - 35 Region mit der für das aacC3 Gen des Plasmids pWP14a beschriebenen RNS-Polymerase Bindestelle übereinstimmte (s. Abb. 6).

Im Gegensatz zu den Plasmiden pWP14a und pWP116a war in pWP113a neben dem aacC3 Gen kein vollständiges oder defektes IS140 Element vorhanden (56). Darüber hinaus lag keine für E. coli typische - 35 Sequenz im Abstand von 15 bp bis 21 bp (57) von der - 10 Region des für das aacC3 Gen angenommenen Promotors vor. Northern Hybridisierung und S1-Nuklease Kartierung könnten hier zeigen, ob die in pWP113a vorhandene, kaum mit der Consensus Sequenz (57) übereinstimmende Promotorstruktur in E. coli benützt wird, oder ob ein anderer Promotor in größerer Entfernung oberhalb vom 5' Ende (nichtkodierender Strang) des aacC3 Gens für die Transkriptionsinitiation verwendet wird. Außerdem könnte dadurch die Effizienz der Transkription der aacC3 Gene der Plasmide pWP14a, pWP116a und pWP113a verglichen werden.

Dies ist der erste Fall einer aus der Natur isolierten Promotorstruktur, welche durch Integration eines IS-Elementes in geeignetem Abstand zu einer bestehenden - 10 Region ("TATAAT-Box") verbessert wurde, d.h. größere Übereinstimmung mit der Consensus Sequenz für E. coli Promotoren (57) aufwies. Ein ähnlicher Befund wurde bei der Untersuchung sog. "promotor-up"-Mutationen des Genortes ampC in E. coli K-12 erhalten (71). In diesem Fall wurde infolge Insertion des Elementes IS2, das ebenfalls eine auswärts gerichtete - 35 Region an einem Ende besitzt, die ursprünglich vorhandene primäre Bindungsstelle für die RNS-Polymerase ersetzt, und der Abstand zur - 10 Region entsprechend der Consensus Sequenz für E. coli Promotoren (57) optimiert, so daß eine ca. 20-fach erhöhte Transkriptionsrate des chromosomalen ß-Lactamase Gens (ampC) erreicht wurde (71). Die terminal wiederholten Sequenzen von IS2 stellen allerdings kein perfektes "inverted repeat" dar, so daß die - 35 Region nur an einem Ende vorkommt, und benachbarte Gene nur bei Insertion von IS2 in Orientierung II aktiviert werden (71). Die Transposons Tn5 und Tn10 (72) enthalten nach außen gerichtete, vollständige Promotorstrukturen, die ebenfalls an der Integrationsstelle vorhandene Gene "anschalten" können. Außer durch Insertion transponierbarer Elemente kann die Effizienz der Transkription von Genen auch durch Mutationen und Deletionen erhöht werden (73). Im Fall des $lacI^{Q1}$ Promotors wurde 50-100-fache Erhöhung der Promotorstärke durch Deletion eines 15 bp Segmentes erreicht, wodurch eine verbesserte - 35 Region entstanden ist (73).

Die genetische Umgebung der untersuchten aacC3 Gene erwies sich als unterschiedlich, während die Strukturgene nah verwandt waren. Die Plasmide pWP14a und pWP116a waren kompatibel und enthielten, wie auch pWP113a, zu Tn3 homologe Sequenzen (z.B. bla), jedoch in unterschiedlichem Abstand von den Gentamicin-Resistenzgenen. Die Verbreitung der aacC3 Gene könnte deswegen durch intra- und intermolekulare homologe oder illegitime Rekombinations- und Deletionsereignisse zwischen verschiedenen Replikons erfolgt sein. Die zur Erklärung der unterschiedlichen genetischen Anordnungen notwendigen rekombinativen Veränderungen könnten durch die Aktivitäten der transponierbaren Elemente IS140 und Tn3 sowie des zellulären recA Genproduktes induziert worden sein. Dabei sind die Strukturgene für die AAC(3)-III Enzyme weitgehend erhalten geblieben, während Promotorsequenzen, genetische Strukturen in der Umgebung und Inkompatibilitätseigenschaften der Plasmide verändert wurden. Die Anpassung einer Zellpopulation an im Biotop vorhandene Antibiotika war somit über Spezies-Grenzen hinweg gewährleistet.

In vereinzelten Fällen wurden AGA-Resistenzgene von Streptomyceten, z.B. aacA (Kanamycin-(6')-Acetyltransferase) von S. kanamyceticus (F. Schmidt, persönl. Mitteilung) oder aphD (Streptomycin-(6)-Phosphoryltransferase) von S. glaucescens (74) in E. coli K-12 exprimiert. Umgekehrt wurden Initiations- und Terminationssignale für die Transkription des ampC Gens aus E. coli von der RNS-Polymerase in S. lividans erkannt (75).

Diese Befunde weisen auf horizontalen Gentransfer zwischen Aktinomyceten und gramnegativen Bakterien hin. IS140, dessen Verbreitung in taxonomisch verschiedenen Bakteriengruppen bisher unbekannt ist, könnte dabei an der Übertragung von AGA-Resistenzgenen in verschiedene Spezies beteiligt gewesen sein (s. Abb. 1) und die Transkriptionseffizienz dieser Gene erhöht haben.

Die untersuchten aacC3 Gene waren,ähnlich wie für aacC4 Gene gezeigt wurde,Teil einer polycistronischen Struktur, deren Transkription im Fall der Plasmide pWP14a und pWP116a von dem teilweise in IS140 lokalisierten Promotor aus erfolgte. Die Genprodukte der sich am 3' Ende der aacC3 Gene anschließenden offenen Leserahmen wurden allerdings noch nicht untersucht. Auch wurde in der bisher bestimmten Sequenz (56) kein Translationsterminationscodon gefunden.

3. Struktur und Expression der Apramycin- und Hygromycin B-Resistenzdeterminanten verwandter Plasmide

Die in dieser Arbeit untersuchten aacC4 Gene erwiesen sich bezüglich Größe und Restriktionsmuster als identisch. Die bisher bekannte DNS-Sequenz der Apramycin- und Hygromycin B-Resistenz kodierenden Region des Plasmids pJR225 (60) stimmte mit dem sequenzierten Bereich des Plasmids pWP7b völlig überein. Im Gegensatz zu den untersuchten aacC3 Genen war eine Veränderung von aacC4 Strukturgenen aufgrund der bisher vorliegenden Ergebnisse nicht nachzuweisen.

Die aacC4 Gene der verwandten Plasmide pWP7b, pWP7a, pWP41a und pJR225 (60) waren stets Teil einer gleichzeitig für Hygromycin B-Resistenz kodierenden polycistronischen Struktur, deren gemeinsamer Promotor am 5' Ende des Apramycin-Resistenzgens lag, und dessen - 35 Region im rechten Ende des assoziierten IS140 Elementes enthalten war.

Die Untersuchung der Codon-Verwendung im Fall der aacC4 und aphH2 Gene dieser operonähnlichen Struktur ergab weitgehend ähnliche Ergebnisse (s. Tab. 6), und entsprach größtenteils der für E. coli typischen Verteilung (76). Jedoch fällt insbesondere die für das aphA Gen von Streptomyces fradiae charakteristische bevorzugte Verwendung von GUC für Valin auf (77), welche bei dem aacC3 Gen von pWP14a ebenfalls beobachtet wurde (56). Im Gegensatz dazu werden in E. coli Genen vor allem die Codons GUA, GUU und GUG benützt (76).

Aus dieser Betrachtung ergibt sich, daß die beiden Gene aacC4 und aphH2 möglicherweise vor längerer Zeit aus Aktinomyceten in gramnegative Bakterien gemeinsam oder unabhängig verbreitet wurden, und an die für E. coli und andere gramnegative Bakterien charakteristische Codon-Verwendung durch Mutationen nachträglich adaptiert wurden. Die Verbreitung der Apramycin- und Hygromycin B-Resistenz kodierenden Plasmide ist jedoch offenbar bisher auf Enterobakterien infizierter Haustiere beschränkt (s. Abb. 20). Zu bemerken ist, daß diese Plasmide, welche für Resistenz gegen Hygromycin B kodieren, einem in der Veterinärmedizin eingesetzten Antibiotikum, gleichzeitig Resistenz gegen Gentamicin und Tobramycin verleihen, zwei in der Therapie schwerer humaner Infektionen verwendeter AGA.

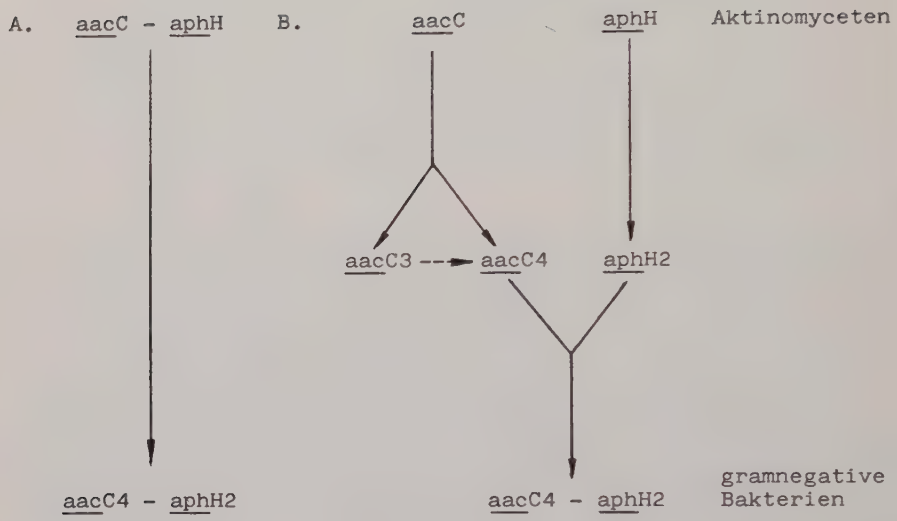

Abbildung 20:

Hypothesen zur Evolution von aacC und aphH Genen. Vorläufergene, welche eventuell in AGA produzierenden Aktinomyceten vorkamen, wurden durch sukzessive mutative Veränderungen in die in gramnegativen Bakterien vorhandenen Resistenzgene umgewandelt. Die polycistronische Struktur aacC4 -aphH2 stammte aus Aktinomyceten (A) oder wurde unter geeignetem Selektionsdruck (16) durch sekundäre Genfusionsereignisse aus aacC und aphH Vorläufergenen gebildet (B). Die Gene aacC3 und aacC4 sind aus einem ursprünglichen aacC Gen unabhängig entstanden, oder das aacC4 Gen ist durch mutative Veränderungen aus dem aacC3 Gen hervorgegangen.

In Staphylococcen könnte aus einem Vorläuferplasmid, das,ähnlich wie im Fall des Plasmids pWP7b,eine polycistronische Struktur zweier AGA-Resistenzgene aufwies, durch Deletionsbildung in der intercistronischen Region ein für ein bifunktionelles AAC(6')/APH(2'') Enzym kodierendes Gen entstanden sein (4). Das für AGA modifizierende Enzyme ungewöhnlich hohe Molekulargewicht von 56 kd dieses Enzyms (4) unterstützt die These, daß es sich um ein Fusionsprotein handelt.

4. Vergleich der aacC3 und aacC4 Gene sowie deren Genprodukte

Die aacC3 und aacC4 Gene der Plasmide pWP14a und pWP7b waren entfernt verwandt und wiesen 39 % DNS-Homologie auf, wobei Insertionen und Deletionen erfolgt waren. Die aus den DNS-Sequenzen ermittelten Aminosäuresequenzen waren 33 % homolog, wobei 183/503 Basenpaaraustausche an der sog. "wobble" Position erfolgt waren. Im Vergleich dazu wurden 298 von insgesamt 614 Basenpaaraustauschen der tetA Gene des Plasmids pBR322 und des Transposons Tn10, welche 49 % DNS-Homologie aufwiesen, an der sog. "wobble" Position festgestellt (67).

Bei den nah verwandten aacC3 Genen der Plasmide pWP14a und pWP113a waren sogar 17/31 Basenpaaraustausche an der "wobble" Position erfolgt, so daß in den kodierten AAC(3)-III Enzymen weitgehend identische Aminosäurereste enthalten waren (56).

Aus Computeranalysen ergaben sich für die AAC(3)-III und AAC(3)-IV Enzyme vor allem in der auch bezüglich der Primärstruktur sehr homologen N-terminalen Hälften übereinstimmende Sekundärstrukturen (s. Abb. 14). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß durch in vitro Deletion der den C-Terminus des AAC(3)-III Enzyms kodierenden Region bei der Konstruktion des Plasmids pWP8661 ein Fusionsprotein mit der von pBR322 kodierten ß-Lactamase gebildet wurde, welches noch zur Acetylierung von Gentamicin in der Lage war. Die C-terminalen Aminosäuren des AAC(3)-III Enzyms scheinen daher offenbar an der katalytischen Funktion und damit an der Ausprägung der Resistenz in vivo nicht beteiligt zu sein. Im Gegensatz dazu wurden bei verschiedenen APH(3') Enzymen konservierte Aminosäuren vorwiegend am C-Terminus festgestellt (6).

Die bisherigen Überlegungen sind in der folgenden Hypothese zusammengefaßt:

Die aacC3 und aacC4 Gene könnten sich aufgrund ihrer entfernten Verwandtschaft vor langer Zeit aus einem gemeinsamen Vorläufergen entwickelt haben, das aus Antibiotika produzierenden Streptomyceten stammte. Alternativ könnte das aacC4 Gen wie in Abbildung 20 dargestellt durch sukzessive Veränderung des aacC3 Gens entstanden sein unter dem Selektionsdruck von in den USA in Feldversuchen für die Behandlung von Schweinen und Rindern eingesetzten hohen Apramycinkonzentrationen (16). Eine konvergente Entwicklung der beiden Gene kann jedoch wegen fehlender Zwischenformen nicht ausgeschlossen werden. Die Verbreitung der aacC3 und aacC4 Gene erfolgte in Form von polycistronischen Strukturen in gramnegativen Bakterien, eventuell mit Hilfe eines assoziierten IS140 Elementes.

Von den für katabolische Enzyme und ß-Lactamasen kodierenden Genen war bereits bekannt, daß unter Selektionsdruck entstandene Mutationen, Genduplikationen oder Rekombinationen zu einem veränderten Substratspektrum führten, meist infolge erniedrigter K_M-Werte für ein Substrat (70, 78). Im Fall der Tyrosyl-tRNA-Synthetase konnte sogar gezeigt werden, daß ein einziger Basenpaaraustausch ausreicht, um den K_M-Wert für ATP 25-fach zu erniedrigen (79). Plasmidkodierte aacC Gene könnten sich auf ähnliche Weise entwickelt haben und durch sukzessive Mutationen und Rekombinationsereignisse, vor allem hervorgerufen durch transponierbare Elemente wie IS140 oder Tn3, an höhere AGA-Konzentrationen adaptiert worden sein bzw. ein erweitertes Substratspektrum erworben haben. Bisher gelang es jedoch nicht, durch in vitro Mutagenese eines aacC Gens ein Genprodukt mit verbesserter Affinität gegenüber einem Substrat zu erzeugen (1).

Derzeit werden von anderen Autoren die Gene für AAC(3)-I (J. Davies, persönl. Mitteilung) und AAC(6')-II (F. Schmidt, persönl. Mitteilung) aus verschiedenen gramnegativen Bakterien sequenziert sowie ein AAC(3) kodierendes Gen aus einem Neomycin produzierenden Streptomyces fradiae Stamm (J. Davies, persönl. Mitteilung). Ein Vergleich dieser DNS-Sequenzen wird zeigen, ob Verwandtschaften mit den aacC3 und aacC4 Genen bestehen.

5. Verbreitung von Gentamicin-Resistenzgenen

Verbreitung von plasmidkodierten Gentamicin-Resistenzgenen in verschiedenen Bakterienspezies erfolgt vor-

wiegend durch Konjugation oder Mobilisation, daneben möglicherweise auch durch Transduktion (s. Abb. 1; 7). Während die Ausbreitung zahlreicher Antibiotika-Resistenzgene in Form von kleinen, stabilen Transposons der Klasse I erfolgt (80), ist kein einziges gesichertes Beispiel eines nur für Gentamicin-Resistenz kodierenden Transposons bekannt. Die als Gentamicin-Resistenz-Transposon beschriebene Struktur Tn732 (13) wurde nicht eindeutig geklärt, und Transposition konnte von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden (J.E. Beringer, persönl. Mitteilung). Gentamicin-Resistenzgene wurden jedoch als Bestandteile größerer, zusammengesetzter Mehrfachresistenz-Transposons der Klasse II (80) nachgewiesen (11, 12).

Bei der Untersuchung von mehr als 50 verschiedenen R-Plasmiden wurde keine Transposition des Gentamicin-Resistenzgens in λ-DNS beobachtet (81). Dagegen war in den Plasmiden pWP12a, pWP14a, pWP7a, pWP7b und pWP41a jeweils das transponierbare Element IS140 neben aacC Genen vorhanden (7, 25), welches die Fusion dieser Plasmide mit anderen Replikons vermittelte. Die Ausbreitung von Gentamicin-Resistenzgenen in verschiedenen Replikons erfolgte offenbar bevorzugt durch assoziierte transponierbare Elemente, wie IS140, und nicht durch die Bildung stabiler Transposonstrukturen.

Die für die aacC3 und aacC4 Gene beschriebenen Assoziationen mit IS-Elementen könnten einem neu entdeckten Typ von Tetracyclin-Resistenz Transposons bei grampositiven Bakterien entsprechen (82), bei denen eine Kopie von IS102 an einem Ende vorlag, während das andere Ende variabel bezüglich der Nukleotid-Sequenz und Länge war. Diese Strukturen bildeten ebenfalls bevor-

zugt Kointegrate. Im Fall des Plasmids pWP14a war Replikonfusion mit P1Cm-Prophagen-DNS jedoch stets durch Duplikation des IS140 Elementes allein erfolgt und nicht durch zusätzliche Verdopplung der Gentamicin-Resistenzdeterminante (7).

6. Inseriert IS140 bei der Kointegratbildung promotor-spezifisch?

Da IS140 mehrfach zwischen - 35 und - 10 Regionen von Promotoren vorgefunden wurde, stellt sich die Frage, ob das Element in promotorähnliche DNS-Sequenzen bevorzugt inseriert. Jedoch wurden nicht an allen Insertionsstellen die für E. coli Promotoren typischen - 10 Regionen gefunden (s. Abb. 21A). Eine auf - 35 Regionen beschränkte promotorspezifische Insertion von IS140 könnte daher postuliert werden. Die folgenden Möglichkeiten der Erkennung der Zielortsequenz durch IS140 sind vorstellbar:

(i) Insertion von IS140 erfolgt im allgemeinen nicht sequenzspezifisch. Durch Selektion auf hohe Gentamicin-Resistenz wurden bei in der Klinik vorkommenden Bakterien zufällig Plasmide erhalten, in denen IS140 eine Promotorstruktur mit erhöhter Transkriptionseffizienz erzeugte.

(ii) Die IS140 kodierte Transposase enthält Domänen für die spezifische Erkennung von - 35 Regionen in der Akzeptor-DNS und in den Enden des Elementes, und ermöglicht durch Protein-DNS-Wechselwirkungen bevorzugte und spezifisch orientierte Integration in Promotorbereiche.

(iii) Basenpaarung zwischen kurzen homologen Sequenzen einer der - 35 Region ähnlichen Sequenz der Akzeptor-DNS und der Enden von IS140, welche jeweils palindrome - 35 Sequenzen aufweisen, erleichtert die Bildung eines Transpositions-initiationskomplexes, der durch anschließende Bindung der IS140 kodierten Transposase und/oder wirtsspezifischer Proteine stabilisiert wird. Während die Erkennungssequenz in der Akzeptor-DNS spezifisch ist, erfolgt der versetzte Schnitt durch die Transposase in kurzem, jedoch variablem Abstand vom 3'Ende der - 35 Region (80).

Die erste Hypothese kann derzeit nicht ausgeschlossen werden, da bisher nur vier Integrationsstellen von IS140 und der sehr ähnlichen bzw. identischen Elemente IS15 und IS26 bekannt sind (s. Abb. 21A). Insertion eines IS140 Derivates, welches,ähnlich wie für IS2 :: Km gezeigt (83),ein in vitro integriertes Kanamycin-Resistenzgen enthält, würde für eine bevorzugte Transposition in - 35 homologe Sequenzen sprechen, ohne daß eine Selektion auf erhöhte Transkriptionseffizienz von Genen nahe der Insertionstelle notwendig wäre.

Transposasen erkennen spezifisch die invertiert wiederholten Sequenzen an den Enden transponierbarer Elemente (80). Das von IS140 kodierte Protein von 234 Aminosäuren könnte folglich Domänen für die spezifische Erkennung von - 35 Regionen enthalten, welche in den Enden des Elementes bzw. in der Akzeptor-DNS vorkommen. Ähnlich wie bei Restriktionsenzymen der Klasse II (80) würde

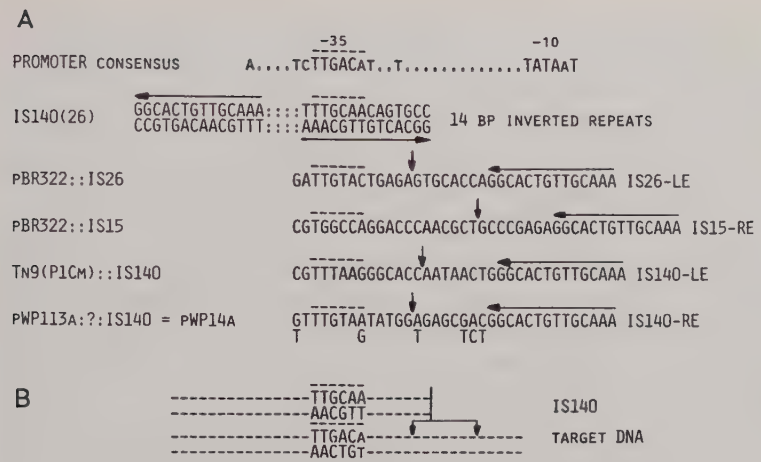

Abbildung 21:

Hypothesen zur Insertionsspezifität von IS140. Hexanukleotidsequenzen ähnlich der - 35 Region von Promotoren an den Insertionsstellen von IS140(IS26) bzw. IS15 wurden aus Literaturdaten (9, 10, 56) und eigenen Ergebnissen zusammengestellt, übereinander angeordnet und durch eine horizontale Linie gekennzeichnet (A). Die mögliche Bedeutung dieser Übereinstimmungen für die spezifische und orientierte Integration von IS140 in bevorzugte Zielortsequenzen wurde dargestellt (B). Für pWP14a wurde eine Insertion von IS140 an der durch einen Pfeil angedeuteten Stelle in die DNS-Sequenz eines zu pWP113a ähnlichen Vorläuferplasmids angenommen. Die in pWP14a im Vergleich zu pWP113a unterschiedlichen Nukleotide wurden unter dieser hypothetischen Sequenz angegeben. Die Sequenzen der perfekten 14 bp "inverted repeats" (IR_L , IR_R) an den Enden von IS140 (9) und die Consensus Sequenz für E. coli Promotoren (57) wurden zum Vergleich gezeigt. Integration von IS140 (IS26) oder IS15 wurde durch einen vertikalen Pfeil angegeben, das 14 bp "inverted repeat" des Elementes durch einen horizontalen Pfeil. Basenpaarung bzw. spezifische Erkennung durch die Transposase der zu den "inverted repeats" von IS140 homologen - 35 Sequenzen an der Akzeptor-DNS (B) führten zu präferentieller Insertion von IS140 am oder in unmittelbarer Nähe vom Ende von IS140 (Pfeile).

in unterschiedlichem Abstand vom 3'Ende der - 35 Region der Akzeptor-DNS ein versetzter Schnitt erfolgen, und die Transposition einleiten (s. Abb. 21B). Der Sigma-Faktor der RNS-Polymerase von E. coli könnte eine ähnliche Spezifität der Primärerkennung von - 35 Regionen besitzen wie IS140 (7b). Die aus DNS-Sequenzen ermittelten Aminosäuresequenzen des IS140 kodierten Proteins (9) und des Sigma-Faktors (76) wurden daher verglichen (nicht gezeigt). Jedoch waren weder in den Primärstrukturen noch in den daraus berechneten Sekundärstrukturen dieser Proteine von sehr unterschiedlicher Größe signifikante Homologien aufzufinden.

Die dritte Hypothese, d.h. die Basenpaarung kurzer Nukleotidsequenzen eines Endes des transponierbaren Elementes und der Akzeptor-DNS, und deren Stabilisierung durch die Transposase oder vom Wirt kodierte Proteine, z.B. RNS-Polymerasen (80), wurde für die transponierbaren Elemente IS1 (84), IS2 (83), Tn3 (80), Tn9 (85), Tn4 (86) und Tn10 (80) bestätigt. Für das Element IS1 wurde bevorzugte, gerichtete Insertion in DNS-Segmente beobachtet, welche die zu den Enden des Elementes homologe hexamere Sequenz $^{5'}$GTGATG$^{3'}$ enthielten (84). Der durch schwache Basenpaarung zwischen kurzen homologen Sequenzen eines Endes des Elementes IS1 und der Akzeptor-DNS gebildete Komplex müßte durch die Transposase oder Faktoren der Wirtszelle stabilisiert werden, um die Transposition zu initiieren (84). Bei der Entstehung von IS1-induzierten Deletionen des Typs I (87) könnten in direkter Orientierung vorhandene Hexa- oder Oktanukleotide beteiligt gewesen sein, welche zu den Enden des im Abstand von ca. 8,5 kb vorliegenden IS1 Elementes homolog waren (87). Im Fall von IS140

könnte in Analogie dazu jeweils eine palindrome - 35 Sequenz am Ende des Elementes mit einer homologen Sequenz in der Akzeptor DNS Wasserstoff Brücken ausbilden (s. Abb. 21A). Nach Stabilisierung durch die IS140 kodierte Transposase würde ein versetzter Schnitt stets am 3'Ende, jedoch in etwas unterschiedlichem Abstand von der - 35 Sequenz in einem Strang der Akzeptor-DNS erfolgen (s. Abb. 21B).

Welcher der drei genannten Mechanismen bei der Bildung der in den Plasmiden pWP14a und pWP7b nachgewiesenen Strukturen verwendet wurde, könnte eventuell durch die Untersuchung weiterer Integrationsstellen von IS140 in anderen Akzeptormolekülen geklärt werden.

Ein Vergleich der DNS-Sequenzen der beiden mit IS140 verwandten Elemente IS15 und IS15Δ (8, 10), welche bevorzugt transponieren bzw. Kointegrate bilden, könnte darüber hinaus einen Hinweis auf den Mechanismus der Transposition und der Auflösung gebildeter Kointegratstrukturen ergeben sowie auf eventuell vorhandene Unterschiede der Spezifität und Häufigkeit der Transposition dieser Elemente. Dies ist vor allem interessant im Hinblick darauf, daß der in IS140 (IS26) vorhandene offene Leserahmen, welcher für ein mögliches Transposase-Protein von 234 Aminosäuren kodiert (9), in IS15 an seinem 3'Ende mit einer IS140 (IS26)-fremden Sequenz fusioniert wurde (8, 10). Unterschiede in der Transpositions-Häufigkeit von IS140 und IS15 könnten daher auf dem Vorhandensein einer veränderten Transposase bzw. Resolvase beruhen oder auf einer eventuell in IS15, aber nicht in IS140 enthaltenen internen Resolutionsstelle (80).

7. Mögliche Anwendungen der im Verlauf dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse

Die im Verlauf dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse könnten auf verschiedene Weise für eine eventuelle Anwendung bedeutsam sein:

(i) Das durch Affinitätschromatographie rasch anreicherbare AAC(3)-IV Enzym eignet sich zur quantitativen Bestimmung von AGA in Körperflüssigkeiten, insbesondere von Tobramycin, welches durch das zu diesem Zweck bisher verwendete AAC(3)-I Enzym nicht bestimmbar war (1).

(ii) Die Plasmide pWP14a und pWP7b könnten für die Konstruktion von Vektoren verwendet werden. Derivate des für Ampicillin- und Gentamicin-Resistenz kodierenden Plasmids pWP14a eignen sich für die Entwicklung von Vektoren mit weitem Wirtsbereich. Die pWP7b kodierten G418- und Hygromycin B-Resistenzgene könnten als positiv selektierbare Eigenschaften bei der Klonierung von Genen in Eukaryonten verwendet werden sowie für die Bildung sog. "cartridges" (88), mit Hilfe derer vorangeschaltete DNS-Segmente bezüglich ihrer Promotoraktivität getestet werden können. Darüber hinaus könnte das aacC4 und aphH2 kodierende Plasmid pWP7b für die Konstruktion sog. Schaukel-Vektoren für beispielsweise Saccharomyces cerevisiae und E. coli eingesetzt werden (18).

(iii) DNS-Fragmente, welche entsprechend der bekannten Sequenzen (25, 56, 60) einen Teil der aacC3, aacC4 oder aphH2 Strukturgene enthalten, könnten für weitere epidemiologische und evolutionäre Studien verwendet werden.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Für die Untersuchung der Verwandtschaft von Genen für Aminoglykosid-(3)-N-Acetyltransferasen wurde in dieser Arbeit die DNS-Sequenz des aacC4 Gens des Plasmids pWP7b aus Salmonella typhimurium bestimmt.

Diese besaß einen einzigen offenen Leserahmen von 783 bp, der für ein Protein vom Molekulargewicht 28,5 kd (261 Aminosäuren) kodierte. Die Transkription dieses Gens erfolgte von einem Promotor aus, dessen Seuqenz gut mit der Consensus Sequenz für E. coli Promotoren (57) übereinstimmte. Das neu entdeckte transponierbare Element IS140 (7) wurde oberhalb des aacC4 Gens lokalisiert. Die Bestimmung des rechten Endes von IS140 durch Vergleich der IS140 proximalen Sequenzen der Plasmide pWP7b, pWP14a und pJOE104 ergab, daß die - 35 Region des Promotors für das aacC4 Gen innerhalb des rechten Endes von IS140 lokalisiert war, während die - 10 Region außerhalb des Elementes lag. Eine analoge Struktur wurde für den Promotor für das aacC3 Gen des Plasmids pWP14a nachgewiesen.

Infolge der palindromen Eigenschaft der in den 14 bp invertiert wiederholten Sequenzen an den Enden von IS140 vorhandenen - 35 Region, war diese sowohl Teil von auswärts gerichteten Promotoren als auch von dem Promotor innerhalb von IS140, welcher für die Transkription der möglichen Transposase von 234 Aminosäuren (9) verwendet wurde.

Dem aacC4 Gen folgte in gleicher Orientierung ein für Hygromycin B-Resistenz kodierendes aphH2 Gen. Die Bestimmung der DNS-Sequenz in der intercistronischen Region ergab, daß keine für E. coli charakteristische Promotorstruktur vorhanden war. Dieser Befund zusammen mit Expressionsstudien an Plasmiden mit unterschiedlichen Deletionen in der aacC4 -aphH2 Region bewies, daß die beiden Gene in einer polycistronischen Struktur vorlagen, deren Transkription von dem dem aacC4 Gen vorangehenden Promotor aus erfolgte.

Die DNS-Sequenz des aacC4 Gens von pWP7b wurde mit der von R. Allmansberger (56) ermittelten DNS-Sequenz des aacC3 Gens des Plasmids pWP14a aus Pseudomonas aeruginosa verglichen. Die Gene erwiesen sich als entfernt verwandt und besaßen 39 % identische Nukleotide, während die kodierten Proteine 33 % homolog waren. Die berechneten Sekundärstrukturen für die AAC(3)-III und AAC(3)-IV Enzyme waren vorwiegend in den auch bezüglich der Primärstruktur stärker konservierten N-terminalen Hälften übereinstimmend.

Das aus der DNS-Sequenz postulierte Genprodukt des aacC4 Gens wurde durch Reinigung und Charakterisierung des auf dem R-Plasmid pWP7b kodierten AAC(3)-IV Enzyms bestätigt. Das Molekulargewicht und die Aminosäuresequenz am N-Terminus des durch Affinitätschromatographie gereinigten Proteins entsprachen dem aus der DNS-Sequenz ermittelten Protein. Das AAC(3)-IV Enzym lag monomer und unprozessiert vor und besaß einen isoelektrischen Punkt von etwa 5,6. Die für das AAC(3)-IV Enzym bestimmten K_M-Werte für verschiedene

AGA-Substrate waren überwiegend in guter Übereinstimmung mit den für diese Antibiotika erhaltenen MHK-Werten von E. coli C600/pWP7b.

Die evolutionäre Verwandtschaft und Herkunft der verschiedenen aacC4 Gene, sowie die Spezifität der Insertion des IS140 Elementes wurden diskutiert.

F. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Davies J, Smith DI (1978)
Ann Rev Microbiol 32: 469 - 518

2. Perlin MH, Lerner SA (1981)
J Bacteriol 147 (2): 320 - 325

3. Courvalin P, Carlier C (1981)
J Antimicrob Chemother 8 (Suppl A): 57 - 69

4. Ubukata K, Yamashita N, Gotoh A, Konno M (1984)
Antimicrob Agents Chemother 25 (6): 754 - 759

5. Beneviste R, Davies J (1973)
Proc Natl Acad Sci USA 70: 2276 - 2280

6. Gray GS, Fitch WM (1983)
Mol Biol Evol 1 (im Druck)

7. Bräu B, Piepersberg W (1983)
Mol Gen Genet 189: 298 - 303

8. Labigne-Roussel A, Gerbaud G, Courvalin P (1981)
Mol Gen Genet 182: 390 - 408

9. Mollet B, Iida S, Shepherd J, Arber W (1983)
Nucleic Acids Res 11 (18): 6319 - 6329

10. Trieu-Cuot P, Labigne-Roussel A, Courvalin P (1983)
Gene 24: 125 - 129

11. Datta N, Nugent M, Richards H (1981)
In Movable Genetic Elements
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology
45: 45 - 51, Cold Spring Harbor, New York

12. Lyon BR, May JW, Skurray RA (1984)
Mol Gen Genet 193: 554 - 556

13. Nugent ME, Bone DH, Datta N (1979) Nature 282: 422 - 423

14. Gómez-Lus R, Rubio-Calvo MC, Navarro M, Vitoria MA,
Chocarro MP, Larrad L (1981)
12th International Congress of Chemotherapy,
Abstract No. 881, Florenz

15. Hedges RW, Shannon KP (1984)
J Gen Microbiol 130: 473 - 482

16. Davies J, O'Connor S (1978)
Antimicrob Agents Chemother 14 (1): 69 - 72

17. Rao RN, Allen NE, Hobbs JN Jr, Alborn WE Jr,
Kirst HA Jr, Paschal JW (1983)
Antimicrob Agents Chemother 24 (5): 689 - 695

18. Gritz L, Davies J (1983)
Gene 25 (2, 3): 179 - 188

19. Messing J, Crea R, Seeburg PH (1981)
Nucleic Acids Res 9: 309 - 321

20. Dougan G, Sherratt D (1977)
Mol Gen Genet 151: 151 - 160

21. Morse EV, Kersting KW, Smith LE, Myhrom EP, Greenwood DE (1978) Am J Pub Health 38: 497 - 499

22. Witchitz JL (1972) J Antibiot 25: 622 - 624

23. Novick RP, Clowes RC, Cohen SN, Curtiss RIII, Datta N, Falkow S (1976) Bacteriol Rev 40: 168 - 169

24. Bräu B (1982) Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität, München

25. Bräu B, Pilz U, Piepersberg W (1984)
Mol Gen Genet 193: 179 - 187

26. Takano T, Ikeda S (1976) Virology 70: 198 - 200

27. Altenbuchner J (1978) Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik der Universität, Regensburg

28. Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heynecker HL, Boyer HW (1977) Gene 2: 95 - 113

29. Rao RN, Rogers SG (1979) Gene 7: 83 - 96

30. Messing J, Vieira J (1982) Gene 19: 269 - 276

31. Miller JH (1972) In Experiments In Molecular Genetics Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

32. Kado CI, Liu ST (1981) J Bacteriol 145: 1365 - 1373

33. Ish-Horowicz, Burke JF (1981)
Nucleic Acids Res 9 (13): 2989 - 2998

34. Clewell DB, Helinski DR (1969)
Proc Natl Acad Sci USA 62: 1159 - 1166

35. Maxam AM, Gilbert W (1977)
Proc Natl Acad Sci USA 74 (2): 560 - 564

36. Cohen SN, Chang ACY, Hsu L (1972)
Proc Natl Acad Sci USA 69 (8): 2110 - 2114

37. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977)
Proc Natl Acad Sci USA 74 (12): 5463 - 5467

38. Hu N-t, Messing J (1982) Gene 17: 271 - 277

39. Gray CP, Sommer R, Polke C, Beck E, Schaller H (1978)
Proc Natl Acad Sci USA 75 (1): 50 - 53

40. Maniatis T, Jeffrey A, Kleid DG (1975)
Proc Natl Acad Sci USA 72 (3): 1184 - 1188

41. Southern EM (1975) J Mol Biol 98: 503 - 517

42. Larson R, Messing J (1983) DNA 2 (1): 31 - 35

43. Zweig SE (1984) Nucleic Acids Res 12 (1): 767 - 776

44. Garnier J, Osguthorpe DJ, Robson B (1978)
J Mol Biol 120: 97 - 120

45. Chou PY, Fasman GD (1978) Adv Enzymol 47: 45 - 148

46. Beneviste R, Davies J (1971) Biochemistry 10: 1787 - 1796

47. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951)
J Biol Chem 193: 265 - 275

48. Laemmli UK (1970) Nature 227: 680 - 685

49. O'Farrell PH (1975) J Biol Chem 250 (10): 4007 - 4021

50. Cleveland DW, Fischer SG, Kirschner MW, Laemmli UK (1977) J Biol Chem 252 (3): 1102 - 1106

51. Chang JY, Brauer D, Wittmann-Liebold B (1978) FEBS Letters 93: 205 - 214

52. Andrews P (1965) Biochem J 96: 595 - 606

53. Bergmeyer HU (1974) Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim

54. Heffron F, Mc Carthy BJ, Ohtsubo H, Ohtsubo E (1979) Cell 18: 1153 - 1163

55. Sutcliffe JG (1978) Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 43: 77 - 90

56. Allmansberger R (1984) Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität, München

57. Hawley DK, Mc Clure MR (1983) Nucleic Acids Res 11 (8): 2237 - 2255

58. Shine J, Dalgarno L (1974) Proc Natl Acad Sci USA 71 (4): 1342 - 1346

59. Iida S, Meyer J, Linder P, Goto N, Nakaya R, Reif H-J, Arber W (1982) Plasmid 8: 187 - 198

60. Kaster KR, Burgett SG, Rao SN, Ingolia TD (1983)
Nucleic Acids Res 11 (19): 6895 - 6911

61. Stormo GD, Schneider TD, Gold LM (1982)
Nucleic Acids Res 10 (9): 2971 - 2996

62. Neidhardt FC, Vaughn V, Phillips TA, Bloch PL (1983)
Microbiol Rev 47 (2): 231 - 284

63. Righetti PG, Tudor G, Ek K (1981)
J Chromatography 220: 115 - 194

64. Lineweaver H, Burk D (1934)
J Amer Chem Soc 56: 658 - 666

65. Silhavy TJ, Benson SA,Emr SD (1983)
Microbiol Rev 47 (3): 313 - 344

66. Davies JE, Beneviste R (1974)
Ann NY Acad Sci 235: 130 - 136

67. Nguyen TT, Postle K, Bertrand KP (1983)
Gene 25: 83 - 92

68. Angelatou F, Litsas SB, Kontomichalou P (1982)
J Antibiotics 35 (2): 235 - 244

69. Williams JW, Northrop DB (1976) Biochemistry 15 (1):
125 - 131

70. Hall A, Knowles JR (1976) Nature 264: 803 - 804

71. Jaurin B, Normark S (1983) Cell 32: 809 - 816

72. Ciampi MS, Schmid MB, Roth JR (1982)
Proc Natl Acad Sci USA 79: 5016 - 5020

73. Calos MP, Miller JH (1981)
Mol Gen Genet 183: 559 - 560

74. Hintermann G (1983) Dissertation am Mikrobiologischen Institut der ETH in Zürich

75. Jaurin B, Cohen SN (1984) Gene 28: 83 - 91

76. Burton Z, Burgess RR, Lin J, Moore D, Holder S, Gross CA (1981) Nucleic Acids Res 9 (12): 2889 - 2903

77. Thompson CJ, Gray GS (1983)
Proc Natl Acad Sci USA 80: 5190 - 5194

78. Hall BG, Zuzel T (1980) Proc Natl Acad Sci USA 77: 3529 - 3533

79. Wilkinson AJ, Fersht AR, Blow DM, Carter P, Winter G (1984) Nature 307: 187 - 188

80. Kleckner N (1981) Ann Rev Genet 15: 341 - 404

81. Piepersberg W, Bräu B, Davies J (1983) J Antibiotics 36 (5): 588 - 594

82. Machida Y, Machida C (1982) Cell 30: 29 - 36

83. Saint-Girons, Fritz HJ, Shaw C, Tillmann E, Starlinger P (1981) Mol Gen Genet 183: 45 - 50

84. Kanazawa H, Kiyasu T, Noumi T, Futai M, Yamaguchi K (1984) Mol Gen Genet 194: 179 - 187

85. Galas DJ, Calos MP, Miller JH (1980) J Mol Biol 144: 19 - 41

86. Hyde DR, Tu CPD (1982) Nucleic Acids Res 10 (13): 3981 - 3991

87. Sommer H, Schumacher B, Saedler H (1981) Mol Gen Genet 184: 300 - 307

88. Close TJ, Rodriguez RL (1982) Gene 20: 305 - 316

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Ludwigs-Maximilians-Universität München unter Leitung von Herrn P.D. Dr.W. Piepersberg von 1982 bis 1984 angefertigt.

Herrn Dr.W. Piepersberg möchte ich für die Anregung zu dieser Arbeit, seine hilfreichen Ratschläge und Diskussionsbeiträge sowie für die wissenschaftliche Förderung, die er mir zuteil werden ließ, herzlich danken.

Für wertvolle Anregungen und Diskussionsbeiträge möchte ich mich bei Herrn Professor Dr.A. Böck bedanken.

Mein Dank gilt auch Frau Ursula Pilz für ihre sorgfältige Assistenz bei einigen Versuchen, Herrn Dr. Foertsch für die freundliche Unterstützung bei der Computerauswertung und Herrn Raimund Drexel für die hilfreichen Ratschläge bei der Aminosäuresequenzierung.

Frau Margit Huber danke ich herzlich für die Reinschrift dieser Arbeit.

Lebenslauf

Am 3. April 1958 wurde ich, Barbara Bräu, als Tochter des Grafikers Heinz Bräu und seiner Frau Rosa Bräu, geb. Käser, in Augsburg geboren.

Von 1964 bis 1968 besuchte ich die Pestalozzi-Grundschule in Augsburg, von 1968 bis 1976 den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig des Gymnasiums in Königsbrunn. Das Reifezeugnis erhielt ich am 25. Juni 1976.

Im Wintersemester 1976/77 begann ich im Fachbereich Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München zu studieren. Im April 1981 legte ich die theoretische Diplom-Hauptprüfung ab.

Von Mai 1981 bis April 1982 fertigte ich meine Diplomarbeit an am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität in München unter Anleitung von Herrn Dr. W. Piepersberg zum Thema "Untersuchungen zur Struktur des Gentamicin-Resistenz kodierenden Plasmids pWP14a und zum Mechanismus seiner Kointegrate mit P1-Phagen". Am 20. April 1982 erhielt ich das Diplomzeugnis.

Im Mai 1982 begann ich unter Anleitung von Herrn Dr. W. Piepersberg mit der Ausarbeitung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität in München.